

Aus dem Institut für Ernährungswissenschaft I
der Justus Liebig-Universität Gießen
Direktor: Prof. Dr. H.-D. Cremer

**Vergleichende Untersuchungen über den im
menschlichen Blut nachweisbaren Anteil
einer oral verabreichten Vitamin A-Dosis
bei unterschiedlich zubereiteten Präparaten**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
bei dem Fachbereich Ernährungswissenschaften
der Justus Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Christina Weis geb. Boese
aus Linden Kr. Landshut

Gießen 1973

Aus dem Institut für Ernährungswissenschaft I
der Justus Liebig-Universität Gießen
Direktor: Prof. Dr. H.-D. Cremer

**Vergleichende Untersuchungen über den im
menschlichen Blut nachweisbaren Anteil
einer oral verabreichten Vitamin A-Dosis
bei unterschiedlich zubereiteten Präparaten**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
bei dem Fachbereich Ernährungswissenschaften
der Justus Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Christina Weis geb. Boese
aus Linden Kr. Landshut

Gießen 1973



D 26

Dekan: Prof. Dr. E. Menden

Referent: Prof. Dr. W. Feldheim

Correferent: Prof. Dr. F. H. Dost

Tag der mündlichen Prüfung: 15. 11. 1973

Gliederung

1. Einleitung

1.1. Allgemeines über Vitamin A

1.1.1. Die chemische Struktur

1.1.2. Stoffwechselwege

1.1.2.1. Überblick

1.1.2.2. Übertritt vom Darmlumen in die Epithelzelle

1.1.2.3. Von der Darmschleimhaut zur Leber

1.1.2.4. Stoffwechsel und Speicherung in der Leber

1.1.2.5. Transport im Blut

1.1.2.6. Vitamin A-Ausscheidung

1.1.2.7. Zusammenfassung

1.2. Bestimmungsmethoden der Vitamin A-Aufnahme

1.2.1. Biologische Tests

1.2.2. Chemische Farbreaktionen

1.2.3. Zusammenfassung

2. Fragestellung

2.1. Literaturübersicht

2.1.1. Vergleich zwischen öligen und wässrigen Vitamin A-Zubereitungen allgemein

2.1.2. Vergleich der Präparate, die in der vorliegenden Versuchsreihe eingesetzt waren

2.1.3. Zusammenfassung der Literaturübersicht

2.2. Fragestellung der Untersuchung

3. Experimenteller Teil

3.1. Die Probanden

3.2. Versuchsanordnung

3.3. Die verabreichten Präparate

- 3.3.1. Zusammensetzung und Zubereitungsform
- 3.3.2. Der Vitamingehalt der untersuchten Stoffe
- 3.3.3. Berechnung und Abmessung der Präparatmenge, die die Testdosis enthält
- 3.3.4. Die Belastung des einzelnen Untersuchungsteilnehmers
- 3.3.5. Art und Zeitpunkt der Applikation
- 3.3.6. Die Blutentnahmezeiten
- 3.3.7. Zusammenfassung
- 3.4. Die Ernährung der Probanden
 - 3.4.1. Zwischen den Versuchstagen
 - 3.4.2. Das Testfrühstück
 - 3.4.3. Das Mittagessen
- 3.5. Die Blutabnahmemethode und die Serumgewinnung
- 3.6. Die Bestimmung der Vitamin A-Konzentration im Serum
 - 3.6.1. Die verwendeten Reagenzien
 - 3.6.2. Der Analysengang
 - 3.6.2.1. Die Isolierung des Vitamin A
 - 3.6.2.2. Die Messung des Carotins
 - 3.6.2.3. Die Vitamin A-Messung
 - 3.6.2.4. Probenverdünnung
 - 3.6.3. Maßnahmen zur Vermeidung von Fehlerquellen
 - 3.6.4. Die Eichung
 - 3.6.4.1. Vitamin A
 - 3.6.4.2. Die Carotinkorrektur
 - 3.6.4.2.1. Carotineichkurve bei 480 μm
 - 3.6.4.2.2. Eichung der Carotin-GDH-Reaktion
 - 3.6.4.2.3. Der Korrekturfaktor
 - 3.6.4.2.4. Zusammenfassung
 - 3.6.5. Die Kontrolle der GDH-Aktivität
 - 3.6.6. Methodengenauigkeit

3.7. Die Auswertung

3.7.1. Die Ermittlung der Resorptionsquoten mit Hilfe der Pharmakokinetik

3.7.1.1. Begriffserklärung

3.7.1.2. Grundlagen

3.7.1.3. Ergänzung des Konzentrationsverlaufs vom Ende der Versuchsperiode bis zur Wiederherstellung des Nüchternwertes

3.7.1.3.1. Der intravenöse Test

3.7.1.3.2. Bei nicht intravenöser (hier oraler) Applikation

3.7.1.4. Die Fläche als Ausdruck des aufgenommenen Anteils

3.7.1.5. Mengenbeziehungen der applizierten Dosis

3.7.1.6. Schlußfolgerungen für die Versuchsanordnung

3.7.1.7. Durchführung der Berechnung am Tischrechner

3.7.1.7.1. Berechnung der Daten des Verteilungsvolumens und der Eliminationskonstanten aus dem Test mit intravenöser Applikation

3.7.1.7.2. Die Resorptionsquoten der oral verabreichten Dosen

3.7.2. Die statistische Bewertung und weitere Beurteilung

4. Ergebnisse

4.1. Ergebnisse der chemischen Analysen der Blutproben

4.1.1. Die Konzentrationsverläufe im Blutserum

4.1.2. Nüchternwerte und Präparatreihenfolge

4.2. Zwischenergebnisse aus dem Rechenprogramm

4.2.1. Die pharmakokinetischen Größen

4.2.2. Vergleich von Transit und Transfer

4.3. Die Resorptionsquoten

4.3.1. Die Werte für den resorbierten Anteil

4.3.2. Die Differenzen der aufgenommenen Anteile

4.3.3. Die Häufigkeitsverteilung der Differenzen der resorbierten Anteile

4.3.4. Statistik

4.4. Weitere Ergebnisse

4.4.1. Die geschmackliche Beurteilung

4.4.2. Die Nahrungsaufnahme und das Rauchen

4.4.3. Die Resorptionsgeschwindigkeit

5. Diskussion

5.1. Das Ziel der Arbeit

5.2. Der Versuchsaufbau

5.3. Die Ergebnisse

6. Zusammenfassung

Literaturverzeichnis

Lebenslauf

1. Einleitung

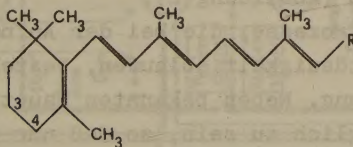
Seit Hopkins (67) 1912 seine Rattenfütterungsversuche mit reinen Nährstoffen durchführte, befaßt sich die Wissenschaft im Rahmen der Vitamin- und Mineralstoffforschung auch mit der Substanz, die wir als "Vitamin A" mit der Nahrung aufnehmen. Ihre chemischen Eigenschaften, ihre Rolle in der Physiologie und ihr Stoffwechsel wurden bereits eingehend untersucht. Immer neues Interesse der Forschung wendet sich dem Problem der Ausnutzbarkeit oral verabreichter Dosen zu. Da man dem ursprünglich fettlöslichen Vitamin A hydrophile Merkmale vermitteln kann, entstehen Präparate, die nicht wie üblich Öl als Träger-substanz für das Vitamin enthalten, sondern eine Öl-in-Wasser-Emulsion darstellen. Die vorliegende Arbeit soll durch einen Vergleich der Resorptionsquoten von Vitaminfabrikaten unterschiedlicher Zubereitungsform bei Menschen einen Beitrag zu diesem Problemkreis liefern.

1.1. Allgemeines über Vitamin A

1.1.1. Die chemische Struktur

Ansatzpunkt für die wissenschaftliche Forschung war die Suche nach der Ursache von Mangelkrankungen der Menschen und Tiere. Im Laufe der Zeit erfaßte man durch chemische Untersuchungen mehrere, chemisch verschiedene Substanzen, die die Fähigkeit besitzen, die heute als Vitamin A-Mangelsyndrom bekannten Erscheinungen (vergleiche 1.2.1.) zu heilen (Abbildung 1).

Abbildung 1 Die Strukturformel von Vitamin A
(Karrer 77)



Die Veränderungen dieser Grundform der Vitamin A-Gruppe, die im wesentlichen in drei Richtungen erfolgen, führen zu den einzelnen Vitamin A-wirksamen Substanzen:

1. Die erste und wichtigste der möglichen Variationen betrifft R (Tabelle 1).

Tabelle 1 Veränderungen von R

R	Name der Verbindung	
	chemische Gruppe	internationale Nomenklatur (IUPAC 70)
-CH ₂ OH	Vitamin A-Alkohol	Retinol
-CH ₂ O-Fettsäure	Vitamin A-Ester	Retinylester
-CHO	Vitamin A-Aldehyd	Retinal
-COOH	Vitamin A-Säure	Retinsäure

2. Es folgen sterische Isomere (trans- und cis-Konfigurationen).

3. Weiterhin kann der Iononring eine zusätzliche Doppelbindung zwischen C₃ und C₄ aufzeigen (Vitamin A₂).

Zahlreiche andere Formen (Maier 111) treten in der Natur auf oder sind synthetisch herstellbar.

Die relative biologische Wirksamkeit (Maier 111, Wodsack 167) der einzelnen Verbindungen bezieht sich auf all-trans-Retinol. Eine internationale Einheit (IE) Vitamin A entspricht 0,3 µg Retinol in einem Standardpräparat (Silvermann 145).

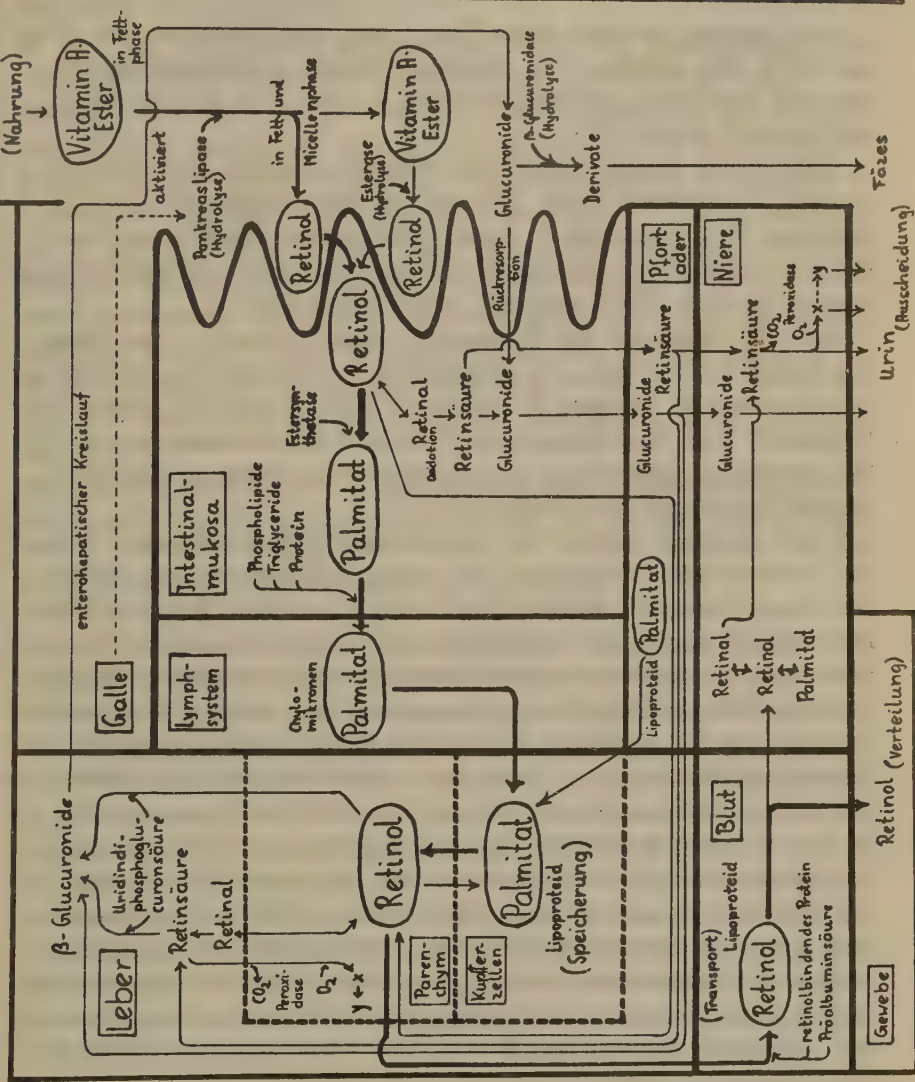
1.1.2. Stoffwechselwege

1.1.2.1. Überblick

Die biochemischen Umwandlungen, denen das mit der Nahrung aufgenommene Vitamin im Organismus unterliegt, werden in nachstehender Übersicht angedeutet (Abbildung 2).

Über die Biochemischen Prozesse, die bei der Aufnahme des Vitamin A in die Kreislaufflüssigkeit ablaufen, besteht noch keine völlige Übereinstimmung. Neben bekannten Hauptschritten scheinen andere Wege möglich zu sein, so daß nur ein unvollständiges Stoffwechselschema aufstellbar ist. Hinzu kommt, daß bei der speziellen Untersuchung einzelner Probleme Tiere oder sogar isolierte Organe als Untersuchungsmaterial dienten, so daß die Ergebnisse nur in Verbindung mit der jeweiligen Versuchsanordnung bewertet werden können.

Darmlumen



1.1.2.2. Übertritt vom Darmlumen in die Epithelzelle

Für die Vitamin A-Versorgung des Menschen kommen drei Quellen in Betracht:

1. Die Nahrung enthält überwiegend den Palmitatester des Vitamin A in Fett gelöst. Die anderen Vitamin A-Analogen werden nur mit bestimmten Nahrungsmitteln aufgenommen und spielen mengenmäßig keine Rolle.
2. Zahlreiche wissenschaftliche Untersuchungen, die sich mit Vitamin A befassen (Week 162, Wagner 160, Kasper 78 S. 87, Braekkan 9, Blomstrand 7, Ganguly 48) gehen von Retinol aus. Dieses ist auch die wirksame Substanz mehrerer pharmazeutischer Präparate (z.B. "Vitaminets", Rote Liste 137).
3. Auf die Vorstufe des Vitamin A - das β -Carotin - sei hier nur hingewiesen (Über die Umwandlung von Carotin zu Vitamin A vergleiche u.a. Goodman 57, Sibbald 144, Glover 55, Kübler 92). Vitamin A wird überwiegend in Öl gelöst aufgenommen und setzt zur optimalen Resorption funktionstüchtige Verdauungsorgane voraus (Literatur bei Kasper 79).

Aus dem Pankreas stammt die spezifische Retinylesterase (Olsen 127, Sastry 138, Mahadevan 108, weitere Literatur bei Kasper 78), die Vitamin A-Palmitat zu Retinol spaltet. Der restliche Esteranteil sowie das entstandene Retinol sind in der Fettphase und in den Micellen des Darminhaltes vorhanden (David 20). Die Dünndarmepithelzellen nehmen das bereits entstandene Retinol aus den Micellen und dem im Chymus enthaltenen Fett direkt auf (Ganguly 48). Das noch vorhandene Retinylpalmitat der beiden Phasen wird durch eine spezifische Esterase, die an der Lumenseite des Bürstensaumes lokalisiert ist (Ganguly 48, Mahadevan 109), hydrolysiert und als Vitamin A-Alkohol aufgenommen (Mahadevan 109). Die Schranke des Bürstensaumes wird also von Retinol überwunden, aufgenommene Retinylester werden erst gespalten. Als Hinweis darauf ist auch zu betrachten, daß der gesamte Bürstensaum von Ratten eine Stunde nach der Fütterung Retinol und Retinylester im Verhältnis zwei zu eins enthält. (David 20).

Wie Kakemi (75) beschreibt, wird die Benetzung der Zellmembran von den dem Vitamin zugesetzten oberflächenaktiven Stoffen maßgeblich beschleunigt.

Die Esterspaltung ist nicht absolute Voraussetzung des Eintritts in die Zelle. Es besteht die Vermutung, daß Vitamin A-Ester auch direkt eindringen kann (Haubold 62, Popper 133, Braekkan 10, Ganguly 48).

An der dem Zellinneren zugewandten Seite des Bürstensaumes unterliegen die gespaltenen Verbindungen der Reveresterung (Ganguly 48) zu Vitamin A-Palmitat. Dies geschieht durch eine spezifische Synthetase (David 19, Mahadevan 109) und unabhängig davon, ob Vitamin A-Azetat, -Linoleat oder andere Ester aufgenommen wurden (Mahadevan 107, Ganguly 48). Hemmt man dieses Enzym in vitro, so kann nach Retinylesterinkubation keine Aufnahme in die Zelle erfolgen. Retinol dagegen wird resorbiert (Mahadevan 109). Die Veresterung zu Palmitat findet unabhängig von der Aufnahme dieser Fettsäure mit der Nahrung statt (Goodman 56, Huang 69, Mahadevan 107).

Auch die Reveresterung scheint nicht obligat zu sein (Westermann 164).

Das Retinol kann anstelle der Veresterung zu anderen Metaboliten oxydiert werden (Lippel 104, Fidge 39 und 40, Moffa 119).

1.1.2.3. Von der Darmschleimhaut zur Leber

Die Dünndarmepithelzellen formen aus dem Hauptanteil des Retinylpalamitats zusammen mit Triglyceriden, Phospholipiden und Proteinen Chylomikronen und geben sie an das Lymphsystem ab (Mahadevan 107, Murray 124, Kübler 98, Westermann 164). Goodman (56) gibt an, daß 70 bis 80% der aufgenommenen radioaktiv markierten Menge an Vitamin A in den gewaschenen Chylomikronen (aus menschlicher Lymphe präpariert) wiederzufinden sind.

Ein Teil des entstandenen Esters wandert auch als Lipoproteidkomplex über das Pfortadersystem direkt zur Leber (Westermann 164, Kübler 98). Kübler (95) gibt für die beiden Wege das Verhältnis 10 zu 1 an. Einige Autoren sehen die zweite Transportbahn als für den Menschen unwesentlich an (Literatur bei Ganguly 47).

1.1.2.4. Stoffwechsel und Speicherung in der Leber

Die Leber ist das Hauptspeicherorgan für Vitamin A (Tabelle 2).

Tabelle 2 Die Vitamin A-Verteilung im menschlichen Organismus (Moore 121)

Organ	Vitamingehalt	
	absolut (IE)	Prozent der Gesamtmenge
Leber	500 000	90,50
andere Organe und Fettgewebe	50 000	9,05
Blutplasma	2 500	0,45
Retina	25	0,005

Eine Untersuchung von 102 plötzlich, nicht durch Krankheit gestorbenen Menschen (Underwood 158, siehe auch Ralli 134) gibt den Vitamin A-Gehalt der Leber mit 126 (7 bis 668) µg/g Frischgewicht an.

Das in der Leber insgesamt enthaltene Vitamin A besteht zu 90% aus Palmitat und zu 10% aus Retinol (Krishnamurthy 89). Hoppe (68) fand bei Wildtieren sogar bis zu 100% Retinylpalmitat. Das Auftreten zweier Fraktionen erklärt sich aus dem Weg des Vitamin A-Palmitats innerhalb der Leber. Es wandert aus dem Blut in die Kupfferzellen, wo es in hypervitaminotischem Zustand vermehrt nachgewiesen wird (Popper 131, Nieman 126). Durch eine spezifische Esterase (Sasthy 138, Mahadevan 110) erfolgt die Spaltung des Retinylesters. Das an ein besonderes Eiweiß gebundene Retinol (Krishnamurthy 90) tritt in die Parenchymzellen ein (Krishnamurthy 90). Von dort wird es über das Blut an andere Organe abgegeben (Mahadevan 110).

Die Aufnahmefähigkeit der Leber für Retinol ist nicht so ausgeprägt wie für Vitamin A-Palmitat (Ganguly 46), da der Retinolgehalt der Leber von Mangelratten schon vier Stunden nach der oralen Belastung mit 14 000 µg Vitamin A ein konstantes Niveau erreicht, die Esterkonzentration aber bis zur 18. Stunde ansteigt.

1.1.2.5. Transport im Blut

Durch Fraktionierung des Blutserums mittels Ultrazentrifuge (Seidel 141) findet man Vitamin A in drei Lipoproteidanteilen:

1. Die der Dichteklasse der Chylomikronen entsprechende $S_f > 400$ -Fraktion (Seidel 141) enthält Retinylester (Roels 136). Das wäre als jener Anteil des Vitamin A zu interpretieren, der über den Lymphweg in das Blutsystem eintritt (vergleiche 1.1.2.3., Roels 136). Dann müßte bei aktiver Resorption starke Konzentrationserhöhung eintreten, was von Kübler (97, wiedergegeben in Abbildung 12 dieser Arbeit) bestätigt wird. Krinsky (88) dagegen findet eine Stunde nach der Applikation von wässrigem Retinol an Menschen keinen vermehrten Retinylgehalt in dieser Lipoproteidfraktion. Die Differenzen ließen sich möglicherweise durch abweichende Trennungsmethoden begründen (Kübler setzt nach 93 die Säulenchromatographie ein, Krinsky die Ultrazentrifuge), woraus sich unterschiedliche Begriffsinhalte ergeben könnten.

2. Eine zweite Fraktion, in der ebenfalls Retinylester nachweisbar ist, liegt nach Roels (136) bei S_f 20 bis 400, nach Krinsky (88) bei S_f 10 bis 100. Krinsky findet hier den Hauptanteil des resorbierten Vitamin A wieder und auch Roels sieht hierin die höchste Fraktion des Retinylesters.

3. Die dritte Lipoproteidfraktion (S_f drei bis neun nach Krinsky (88), S_f null bis zehn nach Roels (136)) enthält etwas Retinol, das aber hauptsächlich an Lipoproteide der Dichteklasse 1,21g/ml gebunden ist (Kanai 76, Peterson 129).

Die Retinylpalmitatfraktionen - also 1. und 2. von oben - und der Retinolgehalt stehen in bestimmtem mengenmäßigen Verhältnis zueinander. Ohne Neuaufnahme aus dem Darm bestehen 10 bis 17% des Gesamtgehaltes des Blutes aus der Esterform (Hoch 65) und etwa 90% aus Retinol (Moore 123, Westermann 164, Week 162) (Tabelle 3).

Tabelle 3 Die Verteilung von Vitamin A-Alkohol und Vitamin A-Ester im menschlichen Serum (Fujita 45)

Alter	Geschlecht	Serumgehalt (μ g%)		Retinol/Gesamtmenge (%)
		Retinol	Retinylester	
28	männlich	45,2	6,54	87,5
31	männlich	43,7	1,98	91,5
46	weiblich	31,0	3,97	88,6

Durch Vitaminzufuhr von außen nimmt der Esteranteil an der im ganzen stark angestiegenen Konzentration Werte bis zu 90% an. Bei Week (162) finden sich Zahlenangaben (Tabelle 4) (desgleichen Fujita 45).

Tabelle 4 Retinol und verestertes Vitamin A im menschlichen Serum, fünf Stunden nach oraler Aufnahme von 134 000 μg Vitamin A ($\mu\text{g}\%$) (Week 162)

Proband	Testsubstanz	Retinol	Retinylester
1 m	Retinol	60,6	697
	Retinylazetat	50,0	580
	Retinylester Nr. 2	59,4	480
1 w	Retinol	66,8	540
	Retinylazetat	36,6	370
	Retinylester Nr. 2	26,7	335

Aus der Literatur (Kübler 93, Dost 24) und dem bisher dargestellten läßt sich diese Veränderung der Vitamin A-Ester- und -Alkoholmengen dadurch erklären, daß der Retinolserumspiegel durch Abgabe aus den Leberreserven auf gleichbleibendem Niveau gehalten wird, während der Retinylesteranteil durch die aktive Aufnahme aus dem Intestinaltrakt beeinflußt wird.

Diese simplifizierende Aussage bedarf jedoch der Einschränkung.

1. Die Vitamin A-Esterfraktion steigt während der Resorptionsdauer hoch an, fällt aber auch rasch wieder ab (Abbildung 3).
2. Es trifft nicht zu, daß die Retinolkonzentration ausschließlich von der Leber gesteuert wird. Sie unterliegt gleichermaßen dem Einfluß der Resorption. So findet man bei Ratten eine dreisigprozentige Betwiliigung des Retinols am Blutspiegelanstieg (Abbildung 4).

3. Die beiden Esterfraktionen (Punkt eins und zwei von oben) verändern sich während der Resorptionsphase nicht gleichstark. Im ersten Teil der ansteigenden Gesamtkurve überwiegt der Chylomikronenanteil, der letzte Abschnitt enthält fast nur noch die

Abbildung 3 Verhalten der Pasmaspiegel nach oraler Belastung mit Vitamin A in öliger Lösung. Erwachsene, weibliche Versuchsperson; Dosis 6 000 IE/kg Körpergewicht (Kübler 93)

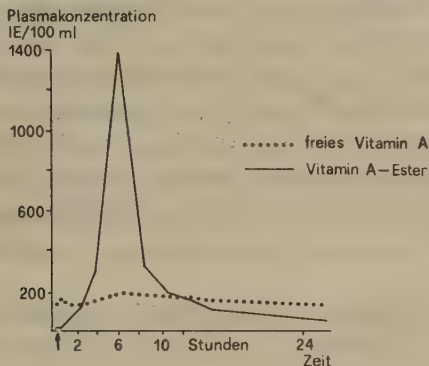
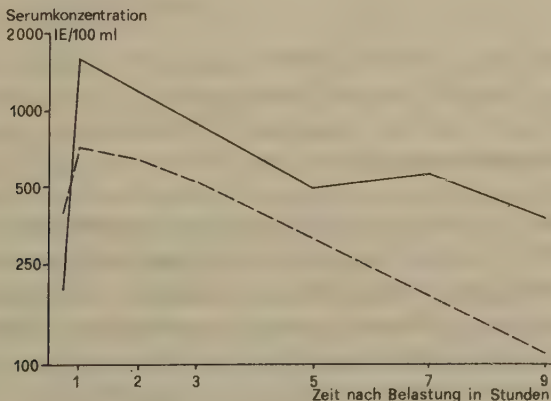


Abbildung 4 Vitamin A-Ester (X—X) und Vitamin A-Alkohol (X---X) im Blutserum nach oraler Gabe von 250 000 IE Vitamin A-Palmitat pro kg Körpergewicht (Westermann 164)

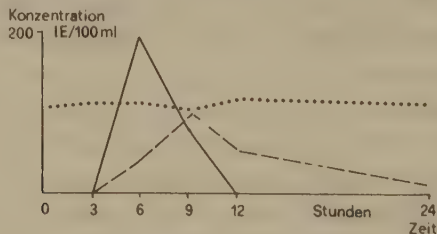


Lipoproteidfraktion (Abbildung 5) (Kübler 97, hier wiedergegeben in Abbildung 12). Westermann (164) erhält an seinen Rat-

ten ein fast identisches Diagramm.

Die Verschiebung des Hauptanteils der Vitamin A-Ester im Blut von der Chylomikronen- zur Lipoproteidfraction ist dadurch bedingt, daß die Umsatzrate unterschiedlich groß ist. Sie beträgt für Chylomikronen eine Stunde (French 44, Kübler 98), für Lipoproteide der S_f 10- bis 400-Fraktion einige Stunden (Fredricksen 43, Kübler 98) und für Lipoproteide des S_f 3- bis 9-Anteils einige Tage (Gitlin 52). Die Umwandlung der Chylomikronen zu Lipoproteiden anderer Dichte findet im RES statt (Roels 136, Marsh 112, Dost 24, Diskussion und Literatur bei Krinsky 88).

Abbildung 5 Vitamin A-Konzentration in den Chylomikronen (—), den β -Lipoproteiden (---) und den restlichen Anteilen (.....) des menschlichen Serums im Verlauf von 24 Stunden, die der Aufnahme von 500 000 E dieses Vitamins bei einem gesunden Probanden folgen (Beaumont 5)



1.1.2.6 Vitamin A-Ausscheidung

Der gesunde Mensch scheidet nur in sehr geringen Mengen unverändertes Vitamin A aus (Mizukami 118). Erst bei andauernder oder hoher Belastung steigt der Stuhlgehalt (Wendt 163, Lewis 103). Personen mit Resorptionsstörungen geben Vitamin A bei jeder Testdosis vermehrt im Stuhl ab (Barnes 3). Urin, Schweiß und Hauttalg enthalten quantitativ unbedeutende Mengen an Vitamin A (Wendt 163).

1.1.2.7 Zusammenfassung

Die Bedarfsdeckung kann (von der Stoffwechsellage her gesehen) durch alle Verbindungen der Vitamin A-Gruppe und das Provitamin

erreicht werden. Der Übertritt in den Organismus erfolgt vorwiegend als Retinol. Die Reveresterung zu Retinylpalmitat wird von dem Transport über die Lymphbahn gefolgt. Als Speicherorgan nimmt die Leber Vitamin A auf und sorgt durch entsprechende Abgabemengen für gleichbleibende Blutspiegelhöhen. Die funktionelle Form des Vitamin A ist, abgesehen vom Retinal im System der Lichtreizverarbeitung (z.B. Wald 161), noch nicht erforscht. Die Exkrete enthalten nur in geringem Umfang unverändertes Vitamin A, die Metaboliten werden vorwiegend über die Galle in den Stuhl abgegeben (Lippel 104), wenn man vom enterohepatischen Kreislauf (Zachmann 169) absieht.

1.2. Bestimmungsmethoden der Vitamin A-Aufnahme

Die Vitaminresorption nach oraler Applikation kann über biologische, physikalische, chemische oder gemischte Verfahren gemessen werden. Die Beschränkung der Darstellung auf die biologischen und chemischen Methoden erklärt sich aus dem Kombinationsverfahren, das für die vorliegenden Experimente eingesetzt wurde.

1.2.1. Biologische Tests

Die biologischen Verfahren (Harris 60) messen den Wirkungsgrad einer Dosis auf Vitamin A-spezifische Vorgänge in einem tierischen oder menschlichen Organismus. Da sich das Versorgungsniveau dabei an der unteren Grenze hält (es überwiegt die Anwendung kurativer Verfahren) sind die meisten Methoden (wie Baumann 4) nur im Tierversuch durchführbar, es sei denn, sie dienen der Gesundheitskontrolle (Kübler 91,96).

Als Parameter im standardisierten Rattenversuch dienen:

1. Wachstum (Green 58, Krennrich 87, Christensen 14) und
2. Mangelsymptome (zusammenfassende Beschreibung derselben bei Lang 100), davon besonders
 - a. Xerophthalmie (Christensen 14) und
 - b. Kolpokeratose (Hohlweg 66).

Hierbei ist der Abstand zwischen der gesuchten Größe (der in den Organismus aufgenommenen Menge einer oral verabreichten Dosis) und der Meßgröße (ein Vitamin A-abhängiger Vorgang) weit. Das Stoffwechselgeschehen enthält zahlreiche Ansatzmög-

lichkeiten für individuell und zeitlich unterschiedlich stark wirkende Kräfte, so daß die Meßgröße nicht ausschließlich von der verabreichten Vitamin A-Menge bestimmt wird.

Im Leberspeichertest nach Guggenheim (59) für Vitamin A-verarmte Ratten besteht eine "annähernd feste Relation" (Brüggemann 12) zwischen oralen Vitamindosen (ölige Zubereitung) und der nach 96 Stunden in der Leber gefundenen Konzentration. Diese Beziehung wird im Leberspeicherwert ausgedrückt und ist durch den Vergleich zwischen einem Standard und der Testsubstanz meßbar (Brüggemann 12). Diese Methode wurde u.a. von Gaßmann (50), Sobel (149), Kunz (99) und Knappstein (86) benutzt.

Als Verfahren zur Erfassung der aufgenommenen Menge einer oral verabreichten Dosis beim Menschen besteht neben Bilanzuntersuchungen die Möglichkeit der Dunkeladaptationsverbesserung, die aber nur unter speziellen Fragestellungen angewandt wird (Studnitz 153, Cüppers 18). Es gilt die Einschränkung von oben. Üblicherweise dient bei Untersuchungen am Menschen der Blutspiegel als Bezugsgröße, denn die geringen Schwierigkeiten, das Analysenmaterial zu erhalten und dessen quantitativ relativ geringe Beschränkung erleichtern die Versuchsdurchführung. Beobachtet wird die Veränderung des Serum- oder Plasmaspiegels nach definierter oraler Dosis. Sie wird als Maß für die Vitamin A-Aufnahme aus dem Darmlumen angesehen. Bezüglich der Korrelation gesuchter zu gemessener Größe vergleiche 2.2.

Da die vorliegende Arbeit Resorptionsquoten von Menschen erfassen sollte, baute man auf diesem Parameter auf.

In der Bewertung der Blutgehaltsveränderung bestehen mehrere Variationen:

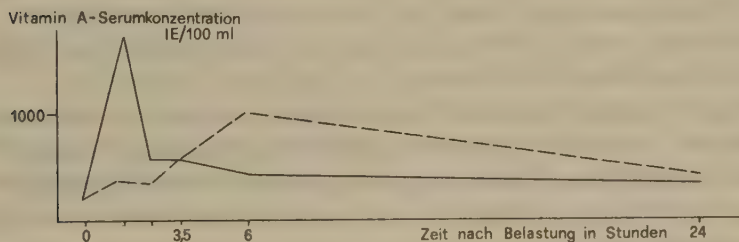
1. Die Blutspiegelerhöhung wird nur einmal zu einem vom Untersuchungsleiter bestimmten Zeitpunkt nach der Applikation gemessen (Tabelle 5).

Tabelle 5 Beispiele der Anwendung eines einzigen Blutspiegelwertes nach oraler Belastung als Maßstab der Vitaminaufnahme

Zeitabstand (Stunden)	Literaturangabe
2	Bisaz 6
3	Fujita 45
4	Litwin 105
4 und 24	Srikantia 151
5	Adlersberg 1 und 2, Week 162

Die Aussagekraft solcher Ergebnisse ist nicht hoch, da die Zeitdimension des Resorptionsgeschehens übergangen wird, die bei gleichen Ergebnissen im zufälligen Meßzeitpunkt doch unterschiedliche Kurvenverläufe bewirken kann (Abbildung 6).

Abbildung 6 Vergleich zwischen den 3,5-Stundenwerten und den Gesamtkurvenverläufen nach Verabfolgung von Testsubstanz A(---) und C (—) bei Proband 1 der vorliegenden Untersuchung (vergleiche Tabelle 46)

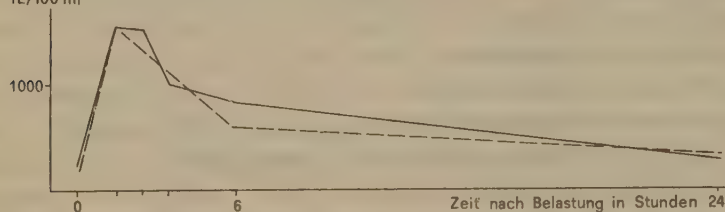


2. Man erfaßt die Veränderung des Blutspiegels innerhalb einer bestimmten Zeitspanne und läßt den Höchstanstieg in die Auswertung eingehen (Anwendung z.B. Kimbel 85, Jones 71, Barnes 3), wodurch die Zeit als Einflußfaktor ansatzweise berücksichtigt wird.

Auch hier besteht möglicherweise keine volle Übereinstimmung zwischen der Gesamtkurve und der gewählten Größe (Abbildung 7).

Abbildung 7 Vergleich zwischen den Maximalwerten und den Gesamtkurvenverläufen nach Applikation von Fabrikat B (---) und C (—) bei Proband 6 der hier beschriebenen Untersuchung (vergleiche Tabelle 46)

Vitamin A-Serumkonzentration
IE/100 ml



3. Eine erhebliche qualitative Verbesserung liegt in der Betrachtung des gesamten Blutspiegelverlaufs in der Untersuchungsperiode. Die Fläche unterhalb der Konzentrationswerte gilt dabei als Repräsentant der aufgenommenen Menge bezogen auf die verabreichte Dosis (vergleiche 3.7.).

4. Da die lückenlose Messung des Blutgehaltes nicht durchführbar ist, werden die in zeitlichem Abstand voneinander erzielten Daten linear verbunden, damit die Willkürlichkeit zeichnerischer Verbindung vermieden wird. Natürlich können neue methodische Fehler entstehen (siehe Tabelle 49 und 51), aber die rechnerische Ermittlung und Kontrolle der Flächengröße wird möglich: Durch die Verbindung der Zeitabstände und Serumgehalte entstehen Teilflächen, die nach der Dreiecks- und Trapezformel erfaßt und zur Gesamtfläche addiert werden können (siehe 3.7.). Week (162) entwickelte eine spezielle Formel zur Bestimmung der Fläche von der zweiten bis zur neunten Stunde nach der Verabreichung. Er hält aber die Gesamtfläche für aussagekräftiger.

5. Das Ergebnis der bis hier beschriebenen Auswertung des Belastungstests wären exakt kontrollierbare Flächen, die sich über den gesamten Meßzeitraum erstrecken. Dieser ist in den einzelnen Versuchen unterschiedlich lang angesetzt (Tabelle 6) und begrenzt dadurch die Vergleichbarkeit der Ergebnisse. Selbst eine Meßperiode, die sich über 24 Stunden erstreckt, liefert nicht unbedingt vergleichbare Werte, da der Blutspiegel in den meisten Fällen innerhalb eines Tages noch nicht auf

Tabelle 6 Meßzeitraum bei verschiedenen Autoren

Zeitspanne (Stunden)	Quelle
4	Shelanski 142
5	Fox 42
7	Jones 71
8	Kimbel 85
9	Kasper 79
24	Kübler 97 (siehe Abbildung 12), Lewis 103, Week 162, Beaumont 5, Dost 24

den Ausgangswert zurückgegangen ist. Für jeden Probanden und jeden Test bleibt eine andere Resterhöhung (Tabelle 7):

Tabelle 7 Wirkung von 168 000 IE Vitamin A-Palmitat (enthalten in Testsubstanzen mit unterschiedlichem Emulgator (Fabrikat B und C)) auf den 24-Stundenwert einer Person (Proband 19 dieser Studie, vergleiche Tabelle 46)

Präparat	Vitamin A-Serumspiegel (in IE/100 ml) zur Zeit ... (Stunden)		Differenz (IE/100 ml)
	0	24	
B	178	382	204
C	210	313	103

Um die wechselnde Größe dieser nach 24 Stunden noch vorhandenen Vitamin A-Erhöhung deutlicher zu erfassen, wurde sie für den vorliegenden Versuch zusätzlich berechnet. Die Ergebnisse sind unter 4.2.2. wiedergegeben.

In der Pharmakokinetik findet sich eine Methode, die diese Schwierigkeit überwindet. Sie kann den zeitlichen Ablauf und die Geschwindigkeit der Veränderung der betroffenen Stoffwechselvorgänge - hervorgerufen durch intravenös injizierte Gaben an Vitamin A und spezifisch für jeden Organismus - aufgrund der Blutspiegelkurven beschreiben und messen. Die erfaßten Parameter erlauben Übertragung auf die Serumkonzentrationskurve nach oral verabreichtem Vitamin und deren Bestimmung über die Meßperiode hinaus bis zur Zeit unendlich. Somit wird die ab-

solute Menge, die nach oraler Applikation im Organismus nachweisbar ist, berechenbar.

Mit Hilfe dieser Möglichkeit wurden in vorliegender Untersuchung die aufgenommenen Anteile der verabreichten Präparate ermittelt.

1.2.2. Chemische Farbreaktionen

Zur Aufstellung der Blutspiegelkurve ist es nötig, die Vitaminkonzentrationen im Serum analytisch zu bestimmen. Aufgrund der Fähigkeit des Vitamin A, mit einigen Stoffen (Krennrich 87) Farbkomplexe zu bilden, wendet man vielfach kolorimetrische Methoden an (Tabelle 8). Andere chemische Verfahren vergleiche z.B. bei Strohecker (152) und Tiews (157).

Tabelle 8 Überblick über einige kolorimetrische Bestimmungsmethoden

Methode	Literaturangabe	Anwendungsbeispiele
Carr-Price (SbCl_3 -Methode) ¹	Carr, Price 13	Adlersberg 2, Lewis 102, Kunz 99, Skála 146, Kimbel 85, Sherman 143, Gaßmann 50
Sobel-Werbin (GDH-Methode) ²	Sobel 147 Abwandlungen: Bisaz 6 Riechert 135 Feldheim 38	Schiaparelli 139, Stüttgen 154, Wulf 168, Sobel 149, Riechert 135, Krennrich 87, Tiews 155, Kasper 79
Neeld-Pearson (TFE-Methode) ³	Neeld 125	Kasper 78, Krennrich 87
Brüggemann	Tiews 157	
Suzuki	Suzuki 155	
Craig-Bergquist (ES-Methode) ⁴	Craig-Bergquist 16	

¹ SbCl_3 = Antimontrichlorid

² GDH = Glycerindichlorhydrin

³ TFE = Trifluoressigsäure

⁴ ES = Eisen-II-Sulfat

Die Kennzeichen der gebräuchlichsten Verfahren, der SbCl_3 - und der GDH-Methode, werden in Tabelle 9 einander gegenübergestellt.

Tabelle 9 Vergleich der SbCl_3 - und GDH-Methode (Sobel 147 und 148, Kasper 78, Krennrich 87)

Merkmal	Verfahren	
	SbCl_3	GDH
reaktionsauslösendes Reagenz	SbCl_3 in Chloroform	GDH mit SbCl_3 aktiviert in Chloroform
Farbkomplex		
maximale Absorption	bei 620 μm	bei 555 μm
Beständigkeit	wenige Minuten	von der zweiten bis zur zehnten Minute konstant
Empfindlichkeit	hoch	geringer
molarer Extinktionskoeffizient	hoch	niedrig
Spezifität	Carotine und Polyene werden mit erfaßt	

Bei Sobel (148) finden sich noch weitere ins einzelne gehende Vergleiche der beiden Methoden bezüglich des Einwirkens von Serumverseifung, Carotininterferenz, Alterung und Feuchtigkeit des Reagenzes auf das Untersuchungsergebnis.

Wegen der längeren Beständigkeit des Farbkomplexes, des unkomplizierten Umgehens mit der GDH-Lösung und der dadurch erheblichen Erleichterung der praktischen Durchführung des Analysenganges wurde in der hier vorgelegten Untersuchung die GDH-Methode in der Veränderung von Feldheim (38) durchgeführt.

1.2.3. Zusammenfassung

Die gebräuchlichste Methode im Tierversuch ist der Leberspeichertest. Die Untersuchung von Menschen bedient sich üblicherweise der Studie von Blutkonzentrationsverläufen, wobei der Aussagewert steigt, wenn die Fläche unter der bis zu ihrem Schnittpunkt mit der Abszisse verlängerten Kurve

die Grundlage des Bewertungsschemas darstellt.

Zur Bestimmung des Vitamin A-Gehaltes der Blutproben bietet die Literatur mehrere Variationen an, von denen die SbCl_3 - und die GDH-Methode die gängigsten Verfahren darstellen.

Diese Studie geht von Blutspiegelkurven aus, die mittels der GDH-Methode entstanden sind und baut auf der Gesamtfläche unter dieser Konzentrationsverlaufskurve auf.

2. Fragestellung

Nach der theoretischen Einführung in den Stoffwechsel des Vitamin A und in die Möglichkeiten zur Erfassung der Vitaminaufnahme nach oraler Verabreichung werden die in der Literatur bereits vorhandenen Ergebnisse auf diesem Gebiet zusammengefaßt und die exakte Fragestellung der Arbeit dargelegt.

2.1. Literaturübersicht

Die Resorption von Vitamin A, das zu den fettlöslichen Vitaminen zu zählen ist, verläuft analog der Fettaufnahme (Haubold 62). Veranlaßt durch Störungen der Fettresorption (z.B. Steatorrhoe) befaßten sich viele Untersuchungen mit der quantitativen Aufnahme des Vitamin A unter definierten Bedingungen (u.a. Fox 42, Kahan 73 und 74, Fitzgerald 41, Kasper 79, Lewis 103, Adlersberg 2, weitere Literatur bei Barnes 3). Dabei stellte man übereinstimmend verminderte Vitaminaufnahme bei Verabreichung von Präparaten, die Vitamin A in öliger Lösung enthielten, fest. Dem öllöslichen Vitamin A konnte durch Erweiterung der galenischen Möglichkeiten Wasserlöslichkeit vermittelt werden. Dadurch entstanden zahlreiche Experimente, die die quantitative Aufnahme, Ausnutzbarkeit und Wirkung oraler Dosen an Vitamin A in Öl gelöst mit den gleichen Parametern von Vitamin A-Gaben in wässriger Form verglichen.

2.1.1. Vergleich zwischen öligen und wässrigen Vitamin A-Zubereitungen allgemein

Christensen (15) fand an Ratten keinen Unterschied in der Aufnahme von Vitamin A mit unterschiedlicher Trägersubstanz (Tabelle 10).

Jones (71) folgerte aus seiner Untersuchung, daß Vitamin A-Ester von Menschen in Öl gelöst gleichstark, aber langsamer aufgenommen wird als emulgierte Präparate (Tabelle 11, Abbildung 8).

Mengenmäßig gleiche Resorption für Vitamin A-Palmitat in Arachisöl und wasserdispersem Retinylpalmitat (Arovit-Tropfen, 1ml enthält 1 mg o-Benzoesäuresulfonamid-Na) ergab auch die

Tabelle 10 Zusammenfassung des Versuchs von Christensen (15)

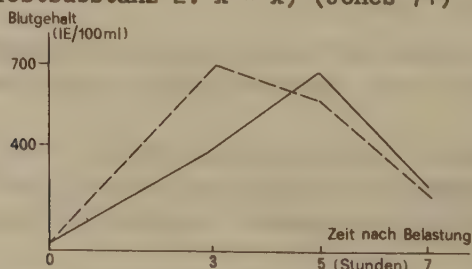
Versuchstiere:	Ratten
Testsubstanz:	1. Vitamin A in Arachisöl (C_{15} - und C_{16} -markiert mit Tritium) 2. Vitamin A mit 25% Tween 80 in 70% Wasser dispergiert
Auswertung:	Verteilung der Radioaktivität in Geweben, Ausscheidung (Bilanz) in 10 Tagen
Ergebnis:	22% der ersten, 37% der zweiten Testsubstanz werden in den Fäzes ausgeschieden, also nicht aufgenommen. Ursache: nicht die Zubereitung, sondern individuelle Schwankungen

Tabelle 11 Übersicht über die Studie von Jones (71)

Probanden:	16 normale Personen
Testsubstanz:	1. Vitamin A-Ester in Lebertran 2. Retinylester in Lebertran mit 2 g Tween 80
Testdosis:	200 000 IE
Blutentnahme:	0, 3, 5, 7 Stunden nach der Belastung
Auswertung:	Serumspiegelmaximum
Ergebnis:	gleich starke, für die Emulsion leicht beschleunigte Resorption (siehe Abbildung 8)

Abbildung 8 Vitamin A-Toleranzkurve, von 16 Personen zusammengefaßt (Testsubstanz: 1:

x—x, Testsubstanz 2: x---x) (Jones 71)



Untersuchung von Kasper (79) an sieben gesunden Kontrollpersonen im Alter von 24 bis 35 Jahren bei einer Dosis von 600 000

IE, die nach dem ersten Frühstück verabreicht wurden, gemessen am Maximalanstieg des Blutgehaltes innerhalb von neun Stunden. Barnes (3) gab nach Applikation von Vitamin A in öligiger Lösung einen geringeren Anstieg des Plasmaspiegels als nach Gabe von wassermischbarem Vitamin an (Tabelle 12 und 13, Abbildung 9).

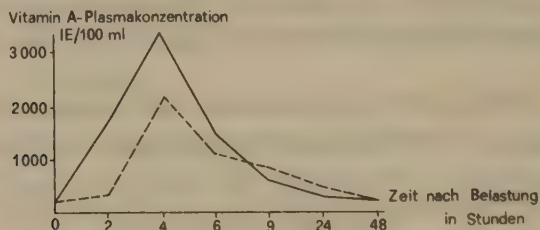
Tabelle 12 Versuchsanordnung und Ergebnisse nach Barnes (3)

Probanden:	12 körperlich gesunde Geistesranke
Testsubstanz:	1. Retinol ($37\ 000\ \text{IE}/\text{cm}^3$) emulgiert mit 40 Volumenprozent Tween 20
	2. Konzentrat natürlicher Vitamin A-Ester in Lebertrankapseln zu je 50 000 IE
Testdosis:	7 500 IE/kg Körpergewicht
	Vorperiode: 60 000 IE/Tag in wassermischbarem Multivitaminpräparat, Dauer: vier Tage
Blutentnahme:	0, 2, 4, 6, 9, 24, 48 Stunden nach der Applika- tion, nach 72 Stunden erfolgte der zweite Test
Auswertung:	Maximum des Plasmaspiegels
Ergebnis:	nach wassermischbaren Präparaten steigt der Blut- spiegel höher an (vergleiche Tabelle 13 und Ab- bildung 9)

Tabelle 13 Höchstanstieg des Plasmagehaltes an Vi-
tamin A (in IE/100 ml) (Barnes 3)

Zubereitungsart	arithmeti - sches Mittel	Standardab- weichung des Mittelwertes	Spannweite
nach mit Wasser ver- mischbarem Vitamin A	3 179	295	1 612 - 4 923
nach Vitamin A in Öl	2 193	353	876 - 4 313

Abbildung 9 Resorptionsvergleich zwischen Vitamin A in öligem (---) und in wässriger (—) Form nach standardisierter oraler Dosis (Barnes 3)



Kimbel (85) wertete gleichfalls nach dem Höchstanstieg des Serums aus und kam zur gleichen Aussage (Tabelle 14).

Tabelle 14 Die Untersuchung von Kimbel (85)

Probanden:	sechs Personen, nicht nüchtern
Testsubstanz:	1. Vitamin A-Palmitat in ölgiger Lösung 2. wasserdispergierbare Tropfenlösung
Testdosis:	300 000 IE
Blutentnahme:	0, 2, 4, 6, 8 Stunden nach der Applikation
Auswertung:	Serummaximum
Ergebnis:	arithmetisches Mittel der Belastungen mit wasserdispergierbarer Substanz: 1 650 IE/100 ml; die Verlaufskurven nach ölig gelöstem Vitamin fallen unterschiedlich aus

Sehr deutliche Unterschiede beschrieb Lewis (102) bei allen Altersstufen (Abbildung 10 als Beispiel). Die Testpräparate bestanden aus ölgelöstem Retinol und Retinylpalmitat in Wasser (53% Wasser, 47% Propylenglycol, Mannitmonolaureat als Emulgator).

In einer späteren Arbeit faßte der gleiche Autor (Lewis 103) die Ergebnisse von Belastungen an 11 Kindern zusammen (Tabelle 15, Abbildung 11).

Abbildung 10 Vitamin A-Blutspiegel von Erwachsenen nach Verabreichung von 500 000 E Vitamin A mit öligem (---) und wässrigem (—) Träger (Lewis 102)

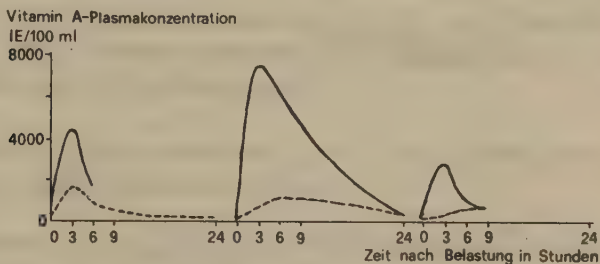
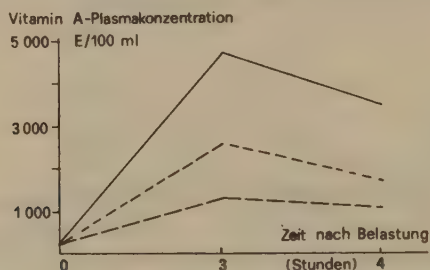


Tabelle 15 Belastungstest an Kindern (Lewis 103)

Probanden:	elf Kinder (6 bis 13 Jahre alt)		
Testsubstanz:	1. Vitamin A in Stachelflosseröl		
	2. Vitamin A-Emulsionen		
	Polyvitamindispersion	}	Retinyl- ester
	Laboratoriumsprodukt Nr. 257		
	Multivitaminemulsion	}	Retinol
	3. wässrige Zubereitungen		
	Vi-Syneral	}	Retinyl- ester
	Poly-Sol		
	Vi-Penta		
Testdosis:	50 000 IE/kg Körpergewicht		
Blutentnahme:	0, 3, 4 (5) Stunden nach der Einnahme		
Ergebnis:	Die verwendeten Zubereitungsarten waren unter sich gleich, unabhängig davon, ob sie Retinol oder Retinylester enthielten (siehe Abbildung 11).		

Die Kontrollgruppe der Sprueuntersuchung (acht Personen) von Fox (42) zeigte gleichfalls bei Lebertran (Retinylester) geringere Resorption als bei der Verabreichung von emulgiertem Retinol (15% Tween 20 enthaltend): 314 µg% gegenüber 695 µg%.

Abbildung 11 Vitamin A-Blutspiegel von Kindern, die
 öliges (— —), emulgiertes (----) und
 wässriges (—) Vitamin A erhalten hatten (Lewis 103)



Durch fluoreszenzmikroskopische Auswertung von Darmschnitten (Ratten) kam Popper (132) zu dem Resultat, daß bei gleicher Menge das ölige Vitamin A (d.h. die unverseifbare Fraktion von Lebertran in Maisöl) verglichen mit Vitamin A in wässrigem Medium (unverseifbare Lebertranfraktion dispergiert mit Sorbitmonolaureatderivat) schlechter resorbiert wird. Für gleichgroße Aufnahme sei die dreifache Dosis an öliger Lösung nötig. Diese Aussage reproduzierte Volk (159), der das gleiche ölige Präparat und wässriges Vitamin A mit 40% Tween 20 emulgiert einsetzte.

An jungen vitaminverarmten Bullen wurde ebenfalls die günstigere Resorption von wässrigen Emulsionen (synthetisches Retinylpalmitat mit 15% Tween 80 in Wasser gelöst) gegenüber Vitamin A in öliger Zubereitung (Heilbutt- und Maisöl) aufgezeigt (Sherman 143).

Auch im Bereich der Pharmakokinetik führte man Vergleichsuntersuchungen durch. Dost (24) beobachtete die Geschwindigkeit der Vorgänge, die die Serumkonzentration nach oraler Belastung mit wasserdispersem Vitamin A-Palmitat (Arovit-Tropfen) und Retinylpalmitat in öliger Zubereitung (Arovit-Ampullen) erhöhen, und drückte sie als Invasionskonstante (siehe Dost 31) aus. Diese bestimmt den Höchstanstieg der Kurve, da sie ihre Steilheit beeinflusst, entscheidend mit. Bei zwei Versuchspersonen fand Dost für das wässrige Fabrikat annähernd gleiche Werte, die

Daten für öliges Vitamin betrugten nur ein Zehntel davon und waren für jeden Probanden verschieden. Die wasserdispergierte Zubereitung des Vitamin A wurde demzufolge etwa zehnmal schneller aufgenommen als öliges Vitamin A.

Diese Literaturzusammenfassung kann nicht vollständig sein. Die hier nicht besprochenen Arbeiten (z.B. Adlersberg 1) enthalten jedoch keine neuen Gesichtspunkte.

2.1.2. Vergleich der Präparate, die in der vorliegenden Versuchsreihe eingesetzt waren

Die Präparate, die in der nachfolgend dargestellten Untersuchung getestet wurden, wurden im Schrifttum bereits unabhängig voneinander mit anderen Fabrikaten der pharmazeutischen Industrie verglichen. Die Bezeichnungen, die die Teststoffe in dem Versuch tragen, von dem hier berichtet werden soll, wurde für die nachstehend wiedergegebenen Studien übernommen.

Studnitz (153) berichtete von einem Dauerversuch, in dem Retinylpalmitat in Öl (Präparat A in dieser Untersuchung) trotz hoher Dosierung nicht auf die Dunkeladaptation (siehe 1.2.1.) wirkte, wohingegen dieselbe mit Gummi arabicum emulgierte Verbindung erhebliche Steigerung erzielte. An Meerschweinchen nahm er mit denselben Stoffen Leberspeichertests vor (vergleiche 1.2.1.), die das obige Resultat der stärkeren Aufnahme von emulgiertem Vitamin A bestätigten (Tabelle 16).

Tabelle 16 Wirkung einer einmaligen Dosis Vitamin A
(250 000 IE/Tier) (Studnitz 153)

Stunden nach Applikation	Lebergehalt	(IE/g)	Gehalt der Augen (IE/g)	
	Emulsion	Öl	Emulsion	Öl
1	119	50	8	8
2	380	269	11	10
4	535	351	15	10
6	562	379	15	12

Cüppers (18) wiederholte diese Untersuchung mit denselben Parametern, jedoch um ein Präparat erweitert. Er reproduzierte das Ergebnis von Studnitz (153).

Eine noch unveröffentlichte Untersuchung von Gažo (51) ermittelt den Resorptionsindex (siehe 1.2.1.) an sechs Hähnchen (30 Tage alt), wobei die Tötung nach 48 Stunden stattfand (Tabelle 17).

Tabelle 17 Resorptionsindex nach 5 000 IE (1)
und 10 000 IE (2) (Gažo 51)

Präparat	Resorptionsindex (%)	
	1	2
Arovit	64	58
Präparat B	74	65
A-Hydrosol	85	66

Ein Resorptionsversuch mit Hunden (Shelanski 142) verdeutlicht die Überlegenheit von Präparat B den anderen dabei eingesetzten Testsubstanzen gegenüber (Tabelle 18).

Tabelle 18 Vitamin A-Serumspiegel ($\mu\text{g}\%$) nach
50 000 IE Vitamin A; Mittelwerte
von je zwei Hunden (Shelanski 142)

Zeit (Minuten)	Präparat B	Aquasol A	Oleovitamin A
vor Belastung			
30	128	123	132
15	125	122	124
nach Dosierung			
15	253	131	128
30	326	139	131
60	442	137	196
120	545	159	200
480	793	191	281

Präparat B wurde nach der Interpretation des Autors schneller und besser aufgenommen als die Vergleichspräparate.

Haubold (62, 63, 64) arbeitete mit sudangefärbten Dünndarmschnitten von Ratten. Fette und Emulsionen zeigen dabei unter sich gleiche, grundsätzlich jedoch verschiedene Bilder. Die

Fette und Öle, sowie die Öllösung von Vitamin A verlieren ihre Farbe in der Kernregion der Dünndarmepithelzellen (Haubold 62), während die Vitamin A-haltigen Emulsionen (Präparat B) noch in den Lymphgängen der Submukosa und im Ductus thoracicus sichtbar sind (Haubold 62). Die Färbung geht verloren, da die Fette hydrolytischer Spaltung unterliegen. Die aufgenommene Menge pro Zeiteinheit sei bei Emulsionen und Öllösungen etwa gleich groß (Haubold 63). Darum folgerte der Autor, daß Fette, Öle und ölgelöstes Vitamin A nach enzymatischer Spaltung an die Pfortader abgegeben werden, wohingegen Fett- und Vitamin A-Emulsionen nach korpuskulärer Aufnahme in das Lymphsystem eintreten (Haubold 62). Haubold schließt daraus, zusätzlich gestützt auf die erheblich stärkere Wirkung der Vitamin A-Emulsionen auf die Dunkeladaptation (Haubold 62), daß die emulgierte Form des Vitamin A auf dem Lymphweg ins Blut und so unter Umgehung der Leber zum Auge gelangt (Haubold 62, 63). Entscheidend für den Weg, den der verabreichte Stoff ginge, wäre sein physikalischer Zustand (Haubold 64). Er müsse eine Korpuskelgröße von $0,3\text{ }\mu\text{m}$ bis $0,5\text{ }\mu\text{m}$ (Haubold 62) besitzen, um optimal als Emulsion resorbiert zu werden. Auch Kübler (94, 95, 97) befaßte sich mit den unterschiedlichen Aufnahmewegen von Vitamin A mit öligem und wässrigem Träger, allerdings bei Menschen. Er zeigte, daß bei gleicher Dosis (1,8 mg Retinylpalmitat, Kübler 97) die Chylomikronenfraktion des Vitamin A-Esters im Blutsystem (siehe 1.1.2.5.) bei Verabreichung von Vitamin A in Öl durch die Lymphstromzeit - das ist die Transportzeit eines Stoffes vom Darmlumen zur Blutbahn (Kübler 95) - um drei Stunden verzögert (Kübler 94) ansteigt, während Vitamin A-Emulsionen diese Latenzzeit nicht aufweisen (vergleiche Kübler 97) (Abbildung 12). Außerdem war der resorbierte Anteil der Emulsion höher als derjenige des in Öl gelösten Vitaminpräparates.

Der Autor stellte daraufhin fest, daß Vitamin A-haltige Emulsionen nicht über die Lymphe aus der Darmschleimhaut abtransportiert würden (Kübler 94). Dies steht im Widerspruch zu der Aussage Haubolds(siehe oben).

Zwei der drei in vorliegender Studie verwandten Präparate (das ölige A und die Emulsion B) setzte man nebeneinander im Leberspeichertest von Brüggemann (12) ein (Tabelle 19). Letzteres schnitt deutlich besser ab.

Abbildung 12 Retinol in verschiedenen Plasmafraktionen nach Belastung mit 1,8 mg Vitamin A-Palmitat in öli- ger Lösung (a) oder in wassermischbarer Form (b) (Kübler 97)

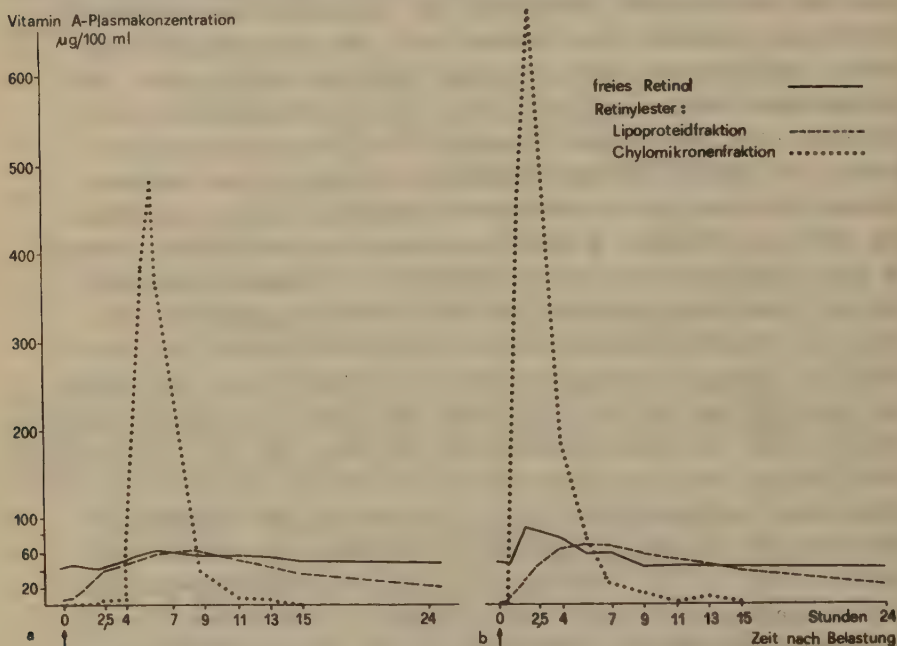


Tabelle 19 Präparat A (ölig) und Präparat B (Emulsion)
im Leberspeichertest von Brüggemann (12)
(die Belastung erfolgte an zwei aufeinander folgenden
Tagen)

Gesamtdosis (IE)	Lebergehalt (IE/g)		Resorptionsindex (%)	
	Präparat A	Präparat B	Präparat A	Präparat B
1 000	211	602	21,1	60,2
2 000	411	1 223	20,2	61,2
3 000	698	1 647	23,3	54,9
4 000	956	2 217	23,9	55,4
		2 593		64,8
Mittelwert	-	-	22,2	59,3

2.1.3. Zusammenfassung der Literaturübersicht

Die referierten Veröffentlichungen lassen sich nach den Ergebnissen folgendermaßen ordnen (Tabelle 20).

Tabelle 20 Die Untersuchungsergebnisse des Schrifttums zum Resorptionsvergleich von öligen und emulgierten Vitamin A-Zubereitungen

Autor	Spezies	Ergebnisse
1. Beide Formen sind gleichgut		
Christensen 15	Ratte	Resorption von gleichen Mengen (siehe Tabelle 10)
Jones 71	Mensch	beide Arten werden gleichstark, die Emulsion aber schneller aufgenommen (siehe Tabelle 11 und Abbildung 8)
Kasper 79	Mensch	kein Unterschied zwischen beiden
Haubold 62	Ratte	die pro Zeiteinheit aufgenommene Menge ist für beide Zubereitungen gleich
2. Vitamin A in Öl wird vermindert aufgenommen		
Barnes 3	Mensch	die Emulsion wird etwa um die Hälfte besser aufgenommen (vergleiche Tabelle 13, Abbildung 9)
Kimbel 85	Mensch	die wasserdispergierbare Zubereitung wird in ausgedehnterem Maße resorbiert (siehe Tabelle 14)
Lewis 102	Mensch	desgleichen (vergleiche Abbildung 10)
Lewis 103	Mensch	öliges Vitamin A wird am schlechtesten von emulgiertem und wässrigem aufgenommen (siehe Abbildung 11)
Fox 42	Mensch	das Retinolemulgat wird in doppeltem Ausmaß wie die Vitamin A-Öllösung resorbiert

Tabelle 20 Fortsetzung

Autor	Spezies	Ergebnisse
Popper 132	Ratte	bei gleichen Mengen tritt Vitamin A in Öl verglichen mit Vitaminemulsionen nur zu einem Drittel in die Darmmukosa ein
Volk 159	Ratte	desgleichen
Sherman 142	Bulle	Vitamin A in Öl wird schlechter resorbiert
Dost 24	Mensch	die Eintrittsgeschwindigkeit des in Öl gelösten Vitamin A beträgt etwa ein Zehntel der der Emulsion
Studnitz 153	Mensch	Vitamin A in Öl verändert die Dunkeladaptation kaum
	Meer-schwein-chen	nicht emulgiertes Vitamin wird kaum resorbiert (Tabelle 16)
Cüppers 18	Mensch	desgleichen
Kübler 97	Mensch	bei gleicher Dosis wird die Vitamin A-Emulsion um etwa 15% besser resorbiert (Abbildung 12)
Brüggemann 12	Ratte	Präparat B(wässrige Emulsion) zeigte den doppelten Leberspeicherindex des Präparates A (Öl als Trägersubstanz) des Vitamins)
3. Vitamin A-Öllösungen und -Emulsionen werden auf verschiedenen Wegen resorbiert		
Haubold 62, 63, 64	Ratte	Vitamin A-Öllösungen werden enzymatisch gespalten und über die Pfortader zur Leber transportiert, während die Emulsionen korpuskulär in die Lymphbahn eintreten

Tabelle 20 Fortsetzung

Autor	Spezies	Ergebnisse
Kübler 94, 95, 97	Mensch	Vitamin A-haltige Emulsionen werden nicht über die Lymphe aus der Darmmukosa abtransportiert
4. Vergleiche von verschiedenen Vitamin A-Emulsionen		
Lewis 103	Mensch	je feiner die Emulsion, desto besser wird sie resorbiert (Abbildung 11)
Gažo 51	Hähnchen	von drei Emulsionen wurde bei der niedrigeren Dosis Präparat B um etwa 10 % besser als das eine und 10 % schlechter als das andere aufgenommen. Bei der höheren Dosis waren Präparat B und das bessere Fabrikat gleich, das schlechtere nur 7 % geringer in der Resorption
Shelanski 142	Hund	Präparat B wurde schneller und besser aufgenommen als das zweite emulgierte Fabrikat

Die Schwierigkeiten dieser vereinfachten Zusammenstellung liegen in den erheblich voneinander abweichenden Versuchsbedingungen.

1. Zu den allgemeinen Vergleichen der Zubereitungsformen

Hier sei nur auf die Versuche an Menschen eingegangen, um die Artspezifität nicht zu übergehen.

a. Bezüglich der Probanden wird manchmal lediglich die Anzahl angegeben (z.B. Dost 24). Alter und Geschlecht bestimmen den Nüchternspiegel mit (Literatur zu dieser Beziehung bei Kasper 78, Kahan 82; Kasper 75 S.23, Kasper 81, Kübler 93, Leitner 101, Mex 117, Popper 130). Diese physiologische Schwankung des Ausgangswertes für den Belastungstest wird dadurch ausgeschaltet, daß lediglich die Blutspiegelveränderungen nach der Testdosis betrachtet werden (vergleiche 1.2.1.). Außerdem liegt die Blutspiegelerhöhung um ein Vielfaches über dem Nüchternwert. Man

sollte jedoch Homogenität der untersuchten Personengruppe anstreben.

b. Der Verlauf der Testkurve ist direkt abhängig vom Gesundheitszustand der Probanden. Für ihn findet man nur verschwommene Maßstäbe, wie aus Tabelle 21 abzulesen ist.

Tabelle 21 Angaben über die Gesundheit der Versuchspersonen

Literatur	Vermerk
Jones 71 (Tabelle 11)	"normal subjects"
Fox 42	"normal control patients"
Kasper 79	gesunde Institutsangehörige
Kübler 95	gesunde Erwachsene
Barnes 3 (Tabelle 12)	körperlich gesunde Geistesranke und Diabetiker
Kimbel 85 (Tabelle 14), Dost 24, Kübler 97	keine Angaben
Week 162	nicht unter ärztlicher Behandlung oder spezieller Diät

Es wäre darauf zu achten, daß nicht nur das Verdauungssystem frei von pathologischen Veränderungen ist, auch andere Krankheiten sollten ausgeschlossen sein. Anderenfalls ließen sich unkontrollierte Einflüsse der veränderten Stoffwechsellaqe nicht ausschließen. Nach Kübler (98) verursacht schon eine Infektion Veränderungen des Vitamin A-Spiegels (siehe Litwin 105).

c. Ausschlaggebend für die Vergleichbarkeit der Ergebnisse ist die Kenntnis der Zusammensetzung der verabreichten Präparate, besonders im Hinblick auf die Wahl des Emulgators und dessen Konzentration (Tabelle 22).

Der Lösungsvermittler gibt der Testsubstanz die physikalische Eigenschaft, d.h. er bestimmt durch die veränderte Oberflächenspannung die Teilchengröße der Öl-in-Wasser-Emulsion. Von dieser hängt nach Meinung vieler Autoren (Jones 71, Barnes 3, Lewis 103) die resorbierte Menge einer oral verabreichten Dosis ab.

Tabelle 22 Art und Menge der in den Emulsionen enthaltenen Lösungsvermittler

oberflächenaktive Verbindung		Literaturangabe
Art	Menge	
Tween 80	15 %	Sherman 143
Tween 80	2 g/Dosis	Jones 71 (Tabelle 11)
Tween 20	40 Volumen- prozent	Barnes 3 (Tabelle 12)
Tween 20	15 %	Fox 42
Mannitmonolaureat	keine Angabe	Lewis 102
Gummi arabicum	0,5 g/cm ³ Öl	Studnitz 153, Cüppers 18
o-Benzoesäuresulfonid-Na (137)	1 mg/ml	Kasper 79, Dost 24
im Handel erhältliches Lecithin	9 - 12 g 10 - 15 g	Adlersberg 1 Adlersberg 2
Cremophor	keine Angabe	Kasper 78 S. 42, 79
Cremophor	1 500 000 IE in 20 cm ³	Stüttgen 154
keine Angabe		Kimbel 85 (Tabelle 14)
keine Angabe		Kübler 97

Haubold (62) nimmt einen Kugelchendurchmesser entsprechend der Muttermilch (0,1 μ bis 10 μ) als optimal an.

Luther (106) beurteilt in einem Vergleich die Präparatzusammensetzungen mit variiertem Tweengehalt (Tabelle 23). Die **Ausnutzbarkeit** steigt demnach mit wachsendem Gehalt an Emulgator und Wasser.

d. Die ungleiche Belastungsdosis (Tabelle 24) bewirkt naturgemäß jeweils unterschiedliche Veränderungsspannen. Die absoluten Meßergebnisse sind nur bei Dosierungen derselben Größenordnung vergleichbar. Desgleichen kann man das Verhältnis von Vitamin A in öliger Lösung zum Vitamin A-Emulgat, das Popper (132) mit drei zu eins und Dost (24) mit zehn zu eins angibt, nur über-

Tabelle 23 Ausnutzbarkeit von Vitamin A-Dispersionen (2 000 IE/cm³)
(Luther 106)

Gruppe	Wasser	Tween	Öl	relative Ausnutzbarkeit
1	--	--	100	100
2	90	4	6	117
3	80	14	6	158
4	60	34	6	173
5	--	40	60	120
6	60	40	--	175

Tabelle 24 Die in der Literatur eingesetzten Dosierungen

Dosis	Quelle
200 000 IE/Person	Jones 71 (Tabelle 11)
300 000 IE/Person	Kimbel 85 (Tabelle 14)
500 000 IE/Person	Lewis 102
600 000 IE/Person	Kasper 79
7 500 IE/kg Gewicht	Barnes 3 (Tabelle 12)
6 000 IE/kg Gewicht	Kübler 97

nehmen, wenn man annimmt, daß bei nicht einheitlicher Dosierung eine höhere Dosis beider Zubereitungen zu einer jeweils prozentual gleichhöheren Serumkonzentration führt.

e. Wichtig für die Beurteilung der Testergebnisse ist auch die Modifikation der Applikationsweise. Es bedarf der Erwähnung, ob die Testperson nüchtern war oder nicht und was sie wann zu sich genommen hat. Kasper (78 und 80) und Krennrich (87) diskutieren neben vielen anderen Autoren den Einfluß der Nährstoffe auf die Vitamin A-Resorption. Die Hinweise in den einzelnen Veröffentlichungen bezüglich der Testmahlzeiten sind verschiedenen (Tabelle 25).

f. In den unterschiedlichen Versuchsaufbau gehen die chemischen Bestimmungen ein, deren Verschiedenheit (Tabelle 8) das Unter-

Tabelle 25 Zur Vitamin A-Dosis gereichte Mahlzeiten

Zusammensetzung	Literatur
keine Angaben	Jones 71, Kasper 79, Barnes 3, Kimbel 85 (Nüchternheit wurde vermerkt)
eine Scheibe Weißbrot, eine Tasse Tee	Adlersberg 1
eine Semmel, 250 cm ³ Kaffee	Dost 24
zwei bis drei Brötchen, 30 bis 40 g Butter, Marmelade	Kasper 78
Toast oder Brot, Kaffee	Week 162
normales Frühstück	Fox 42
Tee, zwei Käsesandwiches (etwa 30 g Fett)	Kahan 74
die Art ist gleichgültig	Paterson 128

suchungsergebnis mit beeinflußt (vergleiche etwa Krennrich 87). g. Auch die Untersuchungszeitspanne (Tabelle 6) ist nicht gleichgroß. Da aber lediglich die Blutspiegelmaxima ausgewertet werden, ist dies für die betreffenden Versuche nicht von Bedeutung. Bei der in der vorliegenden Studie eingesetzten Flächenberechnung als Bewertungsgrundlage ist der Zeitraum der Messungen jedoch wichtig.

h. Die Höhe des Kurvenmaximums im Resorptionstest ist abhängig von den Zeitintervallen der Bestimmung (Tabelle 26). Es muß damit gerechnet werden, daß zwischen den tatsächlich erhaltenen Daten Werte liegen, die eine andere Interpretation der Kurve erfordert hätten.

i. Mit erheblichem Vorbehalt muß eine Auswertungsmethode betrachtet werden, bei der der jeweilige Höchstanstieg der Blutkonzentrationskurve der beiden Testtypen direkt miteinander verglichen wird. Dadurch bewertet man nicht allein die Veränderung von Präparat zu Präparat, sondern auch die innerindividuellen Schwankungen. Letztere sind auszuschalten, indem für jeweils einen Probanden die Differenzen zwischen den Daten

Tabelle 26 Gewählte Zeitpunkte der Blutgehaltsbestimmungen

Zeit (Stunden nach der Belastung)	Quellennachweis
0, 3, 5, 7	Jones 71 (Tabelle 11)
0, 3, 5, 7, 9	Kasper 79
0, 3, 6, 9	Lewis 102 (Abbildung 10)
0, 3, 4 (5)	Lewis 103 (Tabelle 15)
0, 2, 4, 6, 9, 24, 48	Barnes 3 (Tabelle 12)
0, 2, 4, 6, 8	Kimbel 85 (Tabelle 14)

nach Belastung mit ölgelöstem Vitamin A und nach wasserlöslicher Zubereitung gebildet werden. Diese Werte sind dann zwischen verschiedenen Personen vergleichbar (siehe 4.3.2.). Aufgrund der dargelegten Bedenken, besonders der Auswertungsverfahren, erscheint es nicht ohne weiteres möglich, die in der Mehrzahl aufgeführte Interpretation der Versuchsdaten - d.h. die ausgedehntere Resorption der Vitaminemulgate gegenüber den Öllösungen - als endgültig zu übernehmen.

2. Zu den Untersuchungen der hier eingesetzten Präparate

Auch diese Versuchsergebnisse können nicht ohne Einschränkung mit den Ergebnissen nachstehend beschriebener Belastungstests verglichen werden.

Die Langzeitversuche von Studnitz (153) und Clüppers (18) deuten darauf hin, daß das ölige Vitamin A (Präparat A) andere Auswirkungen auf die Lichtreizvermittlung hat als die gleiche Substanz in emulgierter Form (Präparat B). Versuche mit Meer-schweinchen verliefen entsprechend.

Gažo (51) gelangt in seiner Versuchsreihe an Hähnchen zu einem Resorptionsindex für Präparat B, der höher liegt als der von Brüggemann erhaltene Wert an Ratten. Ob das artspezifisch ist oder andere Ursachen haben könnte, ist hier nicht zu diskutieren.

Das Ergebnis von Shelanskis Arbeit (142) ist aufgrund der geringen Tierzahl, der kurzen Untersuchungszeitspanne und dem großen Abstand zwischen der vierten und fünften Messung nach der Belastung nicht als gesichert anzusehen.

Bezüglich der Schlußfolgerung Haubolds (62 bis 64), daß Vitamin A mit öliger Trägersubstanz im Gegensatz zu den Emulsionen über das Pfortadersystem ins Systemblut eintritt, erhebt sich folgender Einwand: Haubold selbst referiert (62), daß sich bei der Resorption die Fettsäuren je nach Länge anders verhalten: die langkettigen wandern in das Lymphsystem, die kurzkettigen in den Pfortaderkreislauf. Da die auf die enzymatische Spaltung des aus dem Darmlumen kommenden Retinylesters erfolgende Reveresterung überwiegend mit Palmitinsäure erfolgt (vergleiche 1.1.2.3.), müßte das verabreichte Vitamin im Ductus thoracicus wiederzufinden sein (siehe dazu Literaturangaben bei 1.1.2.3.) und nicht Haubolds Schlußfolgerung nach in die Leber abtransportiert werden.

Küblers Schluß (94), emulgierte Vitamin A-Lösungen (Präparat B) könnten, da die Latenzzeit nicht auftritt, den Ductus thoracicus umgehen, kann mangels näherer Begründung nicht beurteilt werden. Es bleibt unverständlich, wieso das Vitamin A dann doch noch in der Chylomikronenfraktion enthalten ist, die nur in der Darmmukosa entsteht. Allerdings würde dem die Ar-

beit Krinskys (88) entsprechen, der nach wasserlöslichem Retinol keine wesentliche Erhöhung des Vitamin A-Gehaltes der Chylomikronen feststellen konnte (vergleiche 1.1.2.5.). Im Leberspeichertest vergleicht Brüggemann (12) das ölige Präparat A mit dem Emulgat B. Das erste zeigt weniger als 50 % des Resorptionsindex des zweiten. Dieser deutliche Unterschied darf aber wiederum nur mit dem Hinweis auf die Fragwürdigkeit der Übertragung von Ergebnissen an Versuchstieren auf den Menschen aufgenommen werden.

2.2. Fragestellung der Untersuchung

Die Arbeit befaßt sich mit der Aufnahme von Vitamin A-Präparaten in den menschlichen Organismus nach oraler Zufuhr. Es soll die Resorption von Präparat B, das einen synthetisch hergestellten Emulgator enthält zu der von Präparat C (mit einem oberflächenaktiven Reagenz pflanzlicher Herkunft) in Beziehung gesetzt werden. Der Besprechung der zum Thema vorhandenen Literatur zufolge wird die Resorption einer Vitamin A-Emulsion von der Fähigkeit des Lösungsvermittlers, die hydrophobe Verbindung hydrophil zu machen, beeinflußt. Da die beiden Präparate B und C verschiedene Emulgatoren enthalten, soll versucht werden festzustellen, ob sie sich in den Resorptionsquoten unterscheiden.

Ebenfalls getestet wird ein öliges Fabrikat (Präparat A). Die hier angewandte Auswertungsmethode (siehe 3.7.) erforderte zusätzlich eine intravenöse Applikation, Präparat D.

Da sich die Präparate im Handel befinden, wurden sie in der auf den beigefügten Anwendungshinweisen (siehe Tabelle 33) beschriebenen Art eingenommen, um ihre Wirkung entsprechend der von den Herstellern empfohlenen Einnahmевorschrift zu erfassen. Wenn im Nachfolgenden von "Resorption" oder "resorbierter Quote" geschrieben wird, so versteht man darunter den Anteil der oral verabreichten Dosis, der aus dem Darmlumen kommend im Blut des großen Kreislaufs erscheint und gemessen werden kann (vergleiche dazu Dengler 21). Als Parameter der Bewertung dient nicht mehr das Maximum der Konzentrationsverlaufskurve, sondern die Fläche unterhalb dieser Linie.

3. Experimenteller Teil

Aufgrund der oben dargestellten Fragestellung wurden die Bedingungen aufgestellt, unter denen der Versuch ablaufen sollte.

3.1. Die Probanden

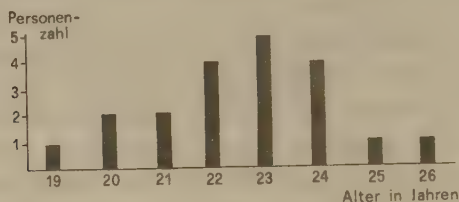
Veranlaßt durch Werbeplakate meldeten sich Freiwillige, die nach Geschlecht, Gesundheitszustand und Alter ausgewählt wurden. Die Untersuchung sollte 20 männliche deutsche Studenten im Alter von 19 bis 26 Jahren umfassen. Auswahlkriterium war eine leere internistische Anamnese. Die zugelassene Personengruppe kann als frei von Stoffwechselkrankheiten angesehen werden. Im einzelnen sind die Versuchspersonen folgendermaßen zu kennzeichnen (Tabelle 27).

Tabelle 27 Überblick über die Teilnehmer

Proband	Alter (Jahre)	Gewicht (kg)	Größe (cm)	Statur	Studienfach
1	24	70	170	schmal	Medizin
2	21	86	187	normal	Vet.-Med.
3	24	65	170	schmal	} Nachrichten- technik
4	23	68	176	normal	
5	23	66	176	normal	Medizin
6	23	70	185	schmal	Germanistik
7	20	81	183	kräftig	Psychologie
8	26	73	180	kräftig	Mathematik
9	22	65	178	normal	Wirtsch.-Wiss.
10	22	75	181	normal	Vet.-Med.
11	23	53	173	mager	Biologie
12	22	68	177	normal	Biologie
13	23	66	177	normal	Oecotroph.
14	19	73	180	normal	Abiturient
15	25	80	173	kräftig	} Nachrichten- technik
16	24	75	187	schmal	
17	21	83	182	kräftig	Psychologie
18	24	71	180	schmal	Geschichte
19	22	74	177	kräftig	Sport
20	20	69	172	normal	Medizin

Da die Auswahl der Probanden nach dem Alter (Abbildung 13) erfolgte, schwankte das Gewicht mit Werten von 65 kg bis 83 kg erheblich, wobei jeweils noch eine Versuchsperson schwerer (86 kg) und eine leichter (53 kg) war (siehe Tabelle 27).

Abbildung 13 Altersverteilung der Probanden



Die zwanzig Untersuchungsteilnehmer wurden auch auf ihre Versorgungssituation und ihre Rauchgewohnheiten hin befragt (Tabelle 28).

Tabelle 28 Aussagen der Probanden bezüglich ihrer Ernährungsgewohnheiten und des täglichen Tabakkonsums

Teilnehmer	Ernährungssituation	Rauchwarenverbrauch
1	Familie	Nichtraucher
2	Mensa, abends nichts	Nichtraucher
3	Selbstversorgung	Nichtraucher
4	Selbstversorgung	11 Zigaretten
5	Kliniksküche	Nichtraucher
6	Mensa und Selbstversorgung	20 bis 30 Zigaretten
7	Mensa	Raucher
8	Selbstversorgung	Raucher
9	Selbstversorgung, Familie	Nichtraucher
10	Mensa	2 bis 20 Zigaretten
11	Selbstversorgung, Mensa	10 Zigaretten
12	Selbstversorgung	24 Zigaretten
13	Mensa, Gastwirtschaft	Nichtraucher
14	Familie	Nichtraucher
15	Familie	Nichtraucher
16	Selbstversorgung, Mensa	Nichtraucher

Fortsetzung Tabelle 28

17	Selbstversorgung, nichts	2 Pfeifen
18	Selbstversorgung, nichts	Nichtraucher
19	Gaststätte	Nichtraucher
20	Mensa, Selbstversorgung	Nichtraucher

Die durchschnittliche Ernährung der einzelnen reichte von reiner Eigenversorgung über Mensabesuch (immer oder nur mittags) bis zur familiären Verköstigung, sowie von kohlenhydratreicher oder fleischreicher Diät bis zu deutlicher Einseitigkeit (aus Bequemlichkeit) (zur Beziehung von Vitamin A-Aufnahme und Nahrungszusammensetzung siehe unter 2.1.3.1.e). Daneben schwankte die täglich verbrauchte Menge an Rauchwaren (desgleichen der nicht exakt erfaßte Alkoholkonsum) von Proband zu Proband. Diese Protokolle wurden geführt, da Mex (117) angibt, Nikotin und Alkohol würden den Vitamin A-Blutspiegel erhöhen. Beides wurde den Versuchspersonen jedoch nicht grundsätzlich untersagt, lediglich zu reichlicher Genuß sollte vermieden werden.

Bezüglich der körperlichen Aktivität unterlagen die Probanden keiner Einschränkung, außer daß nicht an sportlichem Training teilgenommen werden sollte. Proband 19, ein Sportstudent, hatte sich durch eine Fußverletzung von den Übungen befreien lassen müssen, so daß auch er die Forderung erfüllte. Kahan (72 und 74) vergleicht Belastungen von ambulanten Patienten mit denen von Bettlägrigen und findet keine bedeutende Differenz, so daß danach der Einfluß der Körperbewegung auf das Untersuchungsergebnis nicht stark sein kann.

An Besonderheiten betreffs der Testgruppe wäre noch anzuführen, daß Proband eins und zwei Nachtwachen durchführte, Teilnehmer 12 an einem Hautausschlag und Versuchsperson 14 an Grippe erkrankten.

3.2. Versuchsanordnung

Der Versuch wurde im Winterhalbjahr 1971/72 durchgeführt (über die jahreszeitlichen Schwankungen des Vitamin A-Serumspiegels siehe u.a. Kübler 93, Leitner 101). Da für die Verpflegung

der Probanden, die chemischen Analysen sowie die Vorbereitungs- und Aufräumungsarbeiten nur eine Arbeitskraft zur Verfügung stand, konnten lediglich zweimal zwei Personen pro Woche untersucht werden, woraus sich eine Gesamtdauer der Studie von fünf Monaten (18.10.71 - 23.3.72) (Tabelle 29) ergibt. Es entstanden fünf Hauptgruppen zu vier Personen, die wiederum in zwei Paare aufgeteilt waren. Der einzelne Proband wurde im Abstand von einer Woche belastet. Seine Versuchsperiode umfaßte 23 Tage.

Tabelle 29 Die Versuchsgruppen und Zeitspannen der Untersuchung

Einteilung	Zeit	Proband
Gesamtdauer	18.10.71 - 3. 3.72	
Hauptgruppe		
I	18.10.71 - 11.11.71	
II	15.11.71 - 9.12.71	
III	30.12.71 - 24. 1.72	
IV	31. 1.72 - 24. 2.72	
V	28. 2.72 - 23. 3.72	
Untergruppe		
I,1	18.10.71 - 8.11 71	1 und 2
I,2	21.10.71 - 11.11.71	3 und 4
II,1	15.11.71 - 6.12.71	5 und 6
II,2	18.11.71 - 9.12.71	7 und 8
III,1	3. 1.72 - 24. 1.72	9 und 10
III,2	30.12.71 - 20. 1.72	11 und 12
IV,1	31. 1.72 - 21. 2.72	13 und 14
IV,2	3. 2.72 - 24. 2.72	15 und 16
V,1	28. 2.72 - 20. 3.72	17 und 18
V,2	2. 3.72 - 23. 3.72	19 und 20

Das Zeitintervall zwischen den jeweiligen Untersuchungen wurde so groß gewählt, damit dem Organismus Zeit gegeben wurde, den durch die reiche Zufuhr bedingten Ausschlag der Vitamin A-Versorgung zur positiven Seite hin auszugleichen. In der Literatur wird allerdings angeführt, daß der Blutspiegel 24 Stunden nach der Dosisaufnahme das Niveau, das zuvor bestand, erreicht (Stüttgen 154 - Dosis 300 000 IE und 600 000 IE, Schiaparelli

132, Harris 60), was hier nicht bestätigt werden kann (siehe Tabelle 7 und 46).

Die Probanden erschienen nüchtern und erhielten nach der ersten Blutentnahme die Testdosis und das Frühstück (siehe 3.3.5.). Das Mittagessen wurde bei Präparat A und B nach der vierten Blutabnahme, im Falle von Fabrikat C und D vier Stunden nach der Belastung gereicht. Der 24-Stunden-Wert wurde wiederum vor dem Frühstück bestimmt.

3.3. Die verabreichten Präparate

Es handelte sich mit Ausnahme von Substanz D, der Injektionsflüssigkeit, um im Handel befindliche Fabrikate.

3.3.1. Zusammensetzung und Zubereitungsform

Das Vitamin A war in allen Teststoffen als Retinylpalmitat enthalten. Präparat A bestand aus Vitamin A, gelöst in Erdnußöl. Es wurde in Kapseln angeboten. Die Fabrikate B (eine Paste), C (eine Flüssigkeit) und D (Ampullen zur langsamen intravenösen Injektion) enthielten emulgiertes Vitamin A. Sie unterschieden sich durch den Lösungsvermittler, einer natürlichen Substanz pflanzlicher Herkunft bei Präparat B, einer synthetisch hergestellten (Cremophor) bei C und D.

3.3.2. Der Vitamingehalt der untersuchten Stoffe

Das Kontrollabor einer Herstellerfirma überprüfte zwei Monate vor Versuchsbeginn den aufgedruckten Konzentrationswert (Tabelle 30).

Tabelle 30 Die Vitaminkonzentration der Präparate

Präparat	Vitamin A-Menge	
	deklariert	tatsächlich
A	50 000 IE/Kapsel	55 000 IE/Kapsel
B	300 000 IE/10 g	356 000 IE/10 g
C	50 000 IE/ml	58 000 IE/ml
D	150 000 IE/2 ml	168 000 IE/2 ml

Die Vorräte wurden kühl und lichtgeschützt gelagert. Der geringe Aktivitätsabfall während der Gesamtversuchsperiode wurde vernachlässigt (vergleiche Meine 114).

3.3.3. Berechnung und Abmessung der Präparatmenge, die die Testdosis enthält

Aufgrund der tatsächlichen Vitaminkonzentrationen in den Teststoffen entsprechen folgende Quantitäten der Vitamin A-Testdosis von 168 000 IE/Person (Tabelle 31), die durch die vorgegebene Ampullengröße des Teststoffes D nahe lag. Diese Menge beträgt etwa das Dreißigfache der empfohlenen Tagesaufnahme (BGE 22). Die Dosis von Präparat A war nicht anzugleichen, da fertige Kapseln vorlagen. Die geringere Menge beeinträchtigte die Auswertung nicht, da die Berechnung von der jeweiligen Belastung ausgeht (Dost 35).

Tabelle 31 Verabreichte Präparatmenge

Fabrikat	Menge	Vitamingehalt
A	3 Kapseln	165 000 IE
B	4,7191 g	168 000 IE
C	2,862 ml	168 000 IE
D	2 ml	168 000 IE

Zur genauen Abmessung dienten eine Analysenwaage (Exaktheit 10^{-5} g) für Handelsfabrikat B, Enzymtestpipetten bei Präparat C und 2 ml-Spritzen bei D. Von Präparat A wurden drei Kapseln gegeben.

3.3.4. Die Belastung des einzelnen Untersuchungsteilnehmers

Die Reihenfolge der Testpräparate blieb während des gesamten Versuchs gleich (D, A, B, C). Die Dosismenge betrug 168 000 IE/Person. Darum schwankten die verabreichten Einheiten bezogen auf das Körpergewicht (Tabelle 32).

Die geringste Belastung betrug 1 953 IE/kg Körpergewicht für die Präparate B, C, D und 1 818 IE/kg Gewicht bei Präparat A (Proband 2). Die höchste Dosis erhielt Versuchsperson 11

Tabelle 32 Die Testdosis (IE/kg Körpergewicht)
(nach zunehmender Belastung geordnet)

Proband	Präparat A	Präparate B, C, D
2	1 818	1 953
17	1 987	2 024
7	2 037	2 074
15	2 062	2 100
16,10	2 200	2 240
19	2 229	2 270
8,14	2 260	2 301
18	2 323	2 366
6, 1	2 357	2 400
20	2 391	2 434
12, 4	2 426	2 470
13,55	2 500	2 545
9, 3	2 538	2 584
11	3 113	3 169

(3 169 IE/kg Körpergewicht bei den Fabrikaten B, C, D; 3 113 IE/kg Körpergewicht bei Fabrikat A). Vier Probanden erhielten 1 953 IE/kg bis 2 100 IE/kg (Präparat B, C, D), bzw. 1 918 IE/kg bis 2 062 IE/kg Körpergewicht (Präparat A). Fünfzehn Personen wurden 2 239 IE/kg bis zu 2 584 IE/kg Gewicht von den Teststoffen B, C, D und 2 200 IE/kg bis 2 538 IE/kg Gewicht von Fabrikat A gegeben.

Trotz dieser Schwankungen wurde an der Einheitsdosis festgehalten, denn der Versuchsaufbau garantiert, daß jeder Proband seine eigene Kontrollperson ist (vergleiche 3.7.2.).

3.3.5. Art und Zeitpunkt der Applikation

Alle Präparate kamen erst unmittelbar zu ihrer Verwendung aus dem Kühlraum, wo sie vor Lichteinfall geschützt aufbewahrt wurden. Die Ampullen öffnete man direkt vor der Injektion, die innerhalb von 2,5 Minuten in eine Vene des Armes durchgeführt wurde, der nicht der Blutentnahme diente. Die Probanden schluckten die in einer Kapsel enthaltene Testsubstanz A unzerkaut.

Die Emulsion B mußte unverdünnt von einem Uhrgläschen geleckt werden. Die Sauberkeit des Glases wurde überprüft. Die Versuchsteilnehmer erhielten die wässrige Lösung der letzten Testsubstanz (C) in 50 ml Wasser, wobei 30 weitere zum Nachspülen des Glases dienten.

Die Verabreichung der Präparate folgte den Anweisungen der Herstellerfirmen (Tabelle 33).

Tabelle 33 Verabreichung der Dosis

Test	Zeitpunkt
A	direkt vor dem Frühstück
B	zehn Minuten vor dem Frühstück
C	direkt nach dem Frühstück
D	vor dem Frühstück

3.3.6. Die Blutentnahmezeiten

Aus Vorversuchen ergaben sich folgende Zeitabstände der Blutprobennahme von der Belastung an (Tabelle 34).

Tabelle 34 Zeitintervalle der Blutabnahmen

Präparat	Zeit (Stunden)						
A und B	0	1,5	2,5	3,5	6	24	
C	0	2	3	4,5	6	24	
D	0 5/60	0,5	1	2,5	6	24	

Die Anzahl wurde durch die relativ zeitraubende Vitamin A-Bestimmungsmethode (siehe 3.6.) begrenzt. Nach dem Nüchternwert und der Vitamin A-Aufnahme konnten nur vier bis fünf Proben genommen werden. Zusammen mit dem 24 Stunden-Wert ergaben sich sechs bis sieben Bestimmungen bei einem Test.

3.3.7. Zusammenfassung

Tabelle 35 bringt eine Übersicht über die eingesetzten Teststoffe.

Tabelle 35 Die verabreichten Präparate

Merkmal	untersuchtes Fabrikat			
	A	B	C	D
vitaminwirksame Substanz	Vitamin A-Palmitat			
Zubereitung	Erdnußöl-lösung	Emulsion		
Lösungsvermittler	--	Cremophor	pflanzlicher Stoff	Cremophor
deklariert ^r Vitamingehalt	50 000 IE pro Kapsel	300 000 IE in 10 g	50 000 IE pro ml	150 000 IE in 2 ml
tatsächlicher Vitamingehalt	55 000 IE pro Kapsel	356 000 IE in 10 g	58 000 IE pro ml	168 000 IE in 2 ml
verabreichte Dosis	165 000 IE	168 000 IE	168 000 IE	168 000 IE
gegebene Stoffmenge	3 Kapseln	4,7191 g	2,862 ml	2 ml
Applikationsart	oral	oral	oral	intravenös
Belastungszeitpunkt	direkt vor dem Essen	10 Minuten vor dem Essen	direkt nach dem Essen	vor dem Essen

3.4. Die Ernährung der Probanden

3.4.1. Zwischen den Versuchstagen

Die Allgemeine Versorgungssituation wurde unter 3.1. dargestellt. Innerhalb der Gesamtversuchsdauer von 23 Tagen erhielten die Teilnehmer ein standardisiertes Frühstück und Mittagessen an dem jeweiligen Testtag. Um übermäßige Abweichungen der Normalwerte des einzelnen durch die Nahrungsaufnahme am Vortag zu vermeiden, sollte die Versuchsgruppe an dem entspre-

chenden Tag vor der Belastung und am Abend desselben auf Vitamin A-reiche Nahrung (Tabelle 36) verzichten und keine Vitamin-tabletten schlucken.

Tabelle 36 Einige Carotin- und Vitamin A-reiche Lebensmittel (Durchschnittswerte) (Souci 150) (Literatur zum Provitamin A siehe 1.1.2.2.) (1 mg Vitamin A entspricht 3 333 IE, Souci 150)

Nahrungsmittel	mg Vitamin A in 100 g eß- barem Anteil	mg Carotin in 100 g eß- barem Anteil
Margarine	je nach Vitaminierung	
Lebertran	30,00	
Kalbsleber	4,16	
Schweineleber	3,54	
Rinderleber	8,34	
Leberpastete	0,95	
Leberwurst	1,46	
Leberwurst, mager	1,75	
Aal, geräuchert	1,8	
Thunfisch in Öl (feste und flüs- sige Bestandteile)	0,37	
Aprikosen		1,15
Aprikosen, ge- trocknet		3,9
Spinat		4,9
Möhren		8,1

Diese Anordnung galt besonders für den Versuchstag selbst, da sich die Blutbestimmungen über 24 Stunden ausdehnten (siehe Tabelle 34). Durch Vitamin A-reiche Abendmahlzeiten fänden möglicherweise Verschiebungen im 24 Stunden-Wert statt, die nicht mehr allein auf die applizierte Dosis zurückzuführen wären. Aus diesem Grunde wurde Menge, Zusammensetzung und Zeit des Abendessens protokolliert.

3.4.2. Das Testfrühstück

Die Belastungsdosis darf nur zusammen mit einer Mahlzeit erreicht werden, da sonst verzerrte Ergebnisse entstehen (Mendeloff 115, Kasper 78).

Das Standardfrühstück in der vorliegenden Untersuchung enthielt 15 g Butter (Tabelle 37).

Tabelle 37 Zusammensetzung des Frühstücks (Souci 150)(Vitamin A- und Carotingehalt in mg/100 g eßbarem Anteil)

Nahrungsmittel	Menge	Kcal	Fettgehalt		Vitamin A- gehalt	Carotin- gehalt
			in %	in g		
Brötchen	1 (40 g)	108			0	0
Brot	1 Scheibe (40 g)	101			0	0
Butter	15 g	113	81	12	0,1	0,081
Edamer (30 % Fett i.Tr.)	30 g	84	15	4,5	0,045	
roher Schinken (fettfrei)	30 g	51			0	0
Kaffee	2 Tassen					
Zucker	1 Kaffee- löffel	20				
Dosenmilch (7,5 % Fett)	1 Kaffee- löffel	2	7,5	-		
zusammen		484		16,5	0,145	0,081

3.4.3. Das Mittagessen

Für das Mittagessen wurde auf minimalen Fettgehalt und möglichst geringen Vitamin A-Gehalt geachtet (Tabelle 38).

Tabelle 38 Das Mittagessen am Versuchstag
(Souci 150)

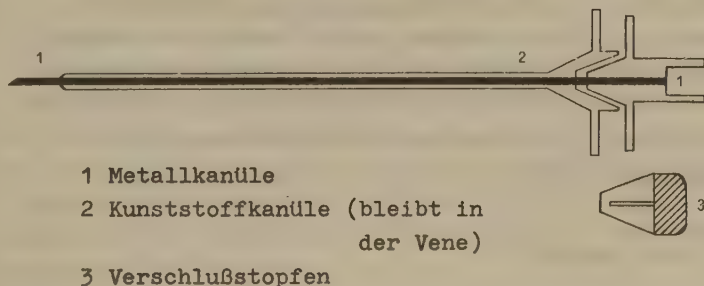
	mg Vitamin A in 100 g eß- barem Anteil	Kcal
Vorspeise:		
150 g gekochter Sellerie	0	60
30 g gekochter Schinken in Würfeln, sichtbares Fett entfernt	0	80
100 g Apfelraspel		54,4
75 g Joghurt	0,020	46,5
5 g Zucker		20
Salz, Pfeffer		0,5
20 g Zitronensaft		5,6
Hauptgericht:		
150 g Kasseler, sichtbares Fett entfernt	Spuren	140
75 g Sauerkraut	0	19,5
50 g Ananaswürfel	0	47,5
40 g Zwiebelwürfel	0	20,8
10 g Zitronensaft		2,8
100 g Kartoffeln		85
Nachtisch:		
2 Eßlöffel entkernte Sauerkirschen		15
10 g Zitronensaft		2,8
3 g Zucker	0	12
2 g Rum		4
1 Messerspitze Mais- stärke	0	2
40 g Vanilleeis	0,052	
Summe	0,072	618,4

3.5. Die Blutabnahmemethode und die Serumgewinnung

Es bot sich die Verwendung von "Braunülen" (Hersteller Braun, Melsungen) (Abbildung 14) an, die die Abhängigkeit von dem betreuenden Arzt, der außerhalb des Gebäudes aufgesucht werden mußte, erheblich herabsetzte.

Der Arzt legte die Venenverweilkanüle. Bevor sie verschlossen wurde, konnte der Nüchternwert genommen werden. Anschließend gab man 0,1 ml bis 0,2 ml Liquemin (Hersteller Hoffmann La Roche; 1 ml enthält 2 500 IE Heparin) in die Braunüle zur Vermeidung von Blutgerinnsel, das die Kanüle verstopft hätte und schloß die Braunüle.

Abbildung 14 Braunüle



Für die folgenden Blutabnahmen benötigte man die ärztliche Unterstützung nicht mehr, da das Öffnen und Schließen unter hygienischen Bedingungen selbständig durchführbar war. Das Blut wurde in 25 ml-Zentrifugengläsern aufgefangen, nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur 20 Minuten bei 3 000 Umdrehungen je Minute zentrifugiert, das Serum abgetrennt und in verschlossenen Gläschen im Kühlschrank aufbewahrt.

3.6. Die Bestimmung der Vitamin A-Konzentration im Serum

Die Analyse der ersten beiden Proben erfolgte noch am Tage der Blutabnahme, die restlichen am darauffolgenden Tag. Das Serum stand niemals länger als 30 Stunden.

Die Untersuchung des Vitamin A-Gesamtgehaltes erfolgte nach der GDH-Methode (Feldheim 38).

3.6.1. Die verwendeten Reagenzien

Die notwendigen Chemikalien lagerten kühl und dunkel (Tabelle 39).

Tabelle 39 Die Chemikalien zur Vitamin A-Bestimmung

Äthanol absolut (zur Analyse)
KOH (LAB, für biochemische Zwecke) als 4 n Lösung in Methanol (zur Analyse), jede Woche frisch hergestellt
Petroleumbenzin (zur Analyse, Siedebereich 40°C bis 60°C)
Chloroform (zur Analyse)
α -Dichlorhydrin (zur Synthese) in dem 4 Gewichtsprozent SbCl_3 (zur Analyse) gelöst wurden und dessen farblose Hauptfraktion in der Vakuumdestillation (78°C bis 80°C) als "aktiviertes" GDH unter Lichtabschluss im Kühlraum aufbewahrt wurde, Reste wurden verworfen.

3.6.2. Der Analysengang

Von jeder Serumprobe wurden mindestens zwei (siehe 3.6.6.), oft drei Bestimmungen durchgeführt. Die Berechnung erfolgte aufgrund der Mittelwerte.

3.6.2.1. Die Isolierung des Vitamin A

Für eine Bestimmung wurden 3 ml Serum in ein Gläschen mit Schliff einpipettiert. Zur Fällung des Eiweißes tropfte man unter kräftigem Schütteln 2 ml Äthanol hinzu. Dann fügte man 1 ml Kalilauge bei, wodurch die Verseifung erreicht wurde. Als Extraktionsmittel dienten 6 ml Petroleumbenzin. Die Gläschen wurden sofort verschlossen und 10 Minuten geschüttelt. Dazu diente ein Gestell, das neun Gläschen aufnehmen konnte. Auf diese Weise wurde die Wärmeübertragung aus der Hand umgangen, es entsteht kein Überdruck, der die Stopfen abheben könnte. Nachdem die Proben 10 Minuten bei 1 000 Umdrehungen

pro Minute zentrifugiert waren, trennte man die obere, vitaminhaltige Schicht ab und zentrifugierte diese schärfer (3 000 Umdrehungen pro Minute, drei Minuten lang). Der saubere Benzinextrakt diente der weiteren Analyse.

3.6.2.2. Die Messung des Carotins

Da die Farbreaktion des Vitamin A mit GDH durch den Carotinhalt des Serums beeinflusst wird (vergleiche etwa Sobel 148), war neben der Vitamin A-Konzentration auch das Carotin zu messen. Dies geschah am Zeiss-M4Q-Photometer durch Messung der Eigenextinktion des Carotins im Benzinextrakt bei 480 μ m in einer 50 mm-Küvette.

3.6.2.3. Die Vitamin A-Messung

4 ml des Benzinextraktes wurden in einem Rundkolben mit Schliff am Rotationsverdampfer bei 30°C abgedampft. Den Rückstand nahm man mit 0,5 ml Chloroform auf, versetzte ihn mit 2 ml GDH, brachte das ganze im Wasserbad auf 25°C und las genau 3 Minuten nach Zugabe der GDH die Extinktion des in einer 50 mm Küvette enthaltenen Reaktionsgemisches am Zeiss-M4Q-Photometer bei 555 μ m ab.

Vitamin A bildet mit GDH einen zunächst blau, dann violett gefärbten Komplex, der sich innerhalb von zwei Minuten zu voller Intensität entwickelt und bis zu zehn Minuten Stabilität aufweist (siehe Tabelle 9) (Beschreibung des Reaktionsmechanismus bei Meunier 116 und Brüggemann 11).

3.6.2.4. Probenverdünnung

Die Rückstände nach der Vakuumdestillation versetzte man mit unterschiedlichen Chloroformmengen, die sich nach der geschätzten Konzentration richteten; 0,5 ml davon wurden angefärbt und gemessen. Der Vorteil, hier zu verdünnen und nicht das Serum direkt mit physiologischer Kochsalzlösung zu versetzen, liegt darin, daß die Originalprobe erhalten bleibt, was wegen der breiten individuellen Schwankungen des Blutspiegels und des darum nur schlecht vorher einzuordnenden

Probengehaltes unbedingt nötig war. Neben der Wiederholungsmöglichkeit erlaubte dieser Weg Parallelmessungen an einem Analysengang und damit die Kontrolle der Durchführungsgenauigkeit.

3.6.3. Maßnahmen zur Vermeidung von Fehlerquellen

Es wurde nur hämolysefreies Serum bearbeitet (Tiews 157). Für jeden Wert führte man mindestens zwei Parallelbestimmungen durch und von jeder Analyse entstanden je nach Verdünnung mehrere Meßwerte. Ein Analysengang bestand aus acht bis neun Bestimmungen, die nebeneinander durchgeführt werden konnten. Die gesamte Arbeit erfolgte in diffusem, abgeschwächtem Licht. Reagenzzusatz und Messung der Probe erfolgte im Dunkeln.

3.6.4. Die Eichung

3.6.4.1. Vitamin A

Zur Umrechnung der bei der Probenuntersuchung abgelesenen Extinktion auf die Vitamin A-Konzentration in 100 ml Serum geht man von der allgemeinen Umrechnungsgleichung (1) aus.

$$(1) \quad \text{Vitamin A-Konzentration} = E_a \cdot F_A \quad \begin{array}{l} E = \text{Extinktion} \\ F = \text{Faktor} \\ a = \text{abgelesen} \\ A = \text{Vitamin A} \end{array}$$

(IE/100 ml Serum)

Werden bekannte Konzentrationen vorgelegt, kann mit Hilfe der abgelesenen Extinktion der Umrechnungsfaktor (F_A) errechnet werden (2).

$$(2) \quad F_A = E_a : \text{Vitamin A-Konzentration (IE/100 ml Serum)}$$

Da F_A von der Aktivität der GDH entscheidend abhängt, war für jede neu hergestellte GDH-Lösung eine eigene Eichkurve aufzustellen. Als Eichsubstanz diente Präparat C, das in Wasser aufgelöst wurde. Diese Stammflüssigkeit durchlief in entsprechenden Standardverdünnungen (Tabelle 40) den für jede Serumprobe vorgeschriebenen Analysengang.

Die Konzentration der Standards entspricht der des Serums, da ja mit der Standardverdünnung die gleichen Volumenveränderungen vorgenommen wurden wie mit dem Serum.

Tabelle 40 Die Vitamin A-Eichlösungen
(IE/100 ml Lösung)

Stammlösung	5 870	
Standard-	GDH-Ansatz	
verdünnung	I, II	III, IV, V
1	587	
2	1 174	
3	1 761	1 761
4	2 348	2 348
5		2 935
6	3 522	3 522

Die gemessenen Extinktionen sind zusammen mit den zugehörigen Konzentrationen in Gleichung (2) einzusetzen. Als Ergebnis erhält man die Umrechnungsfaktoren von der Standardlösung auf 100 ml Serum ($F_A, I - V$) (Tabelle 41).

Tabelle 41 Die Umrechnungsfaktoren F_A

GDH-Charge	I	II	III	IV	V
Faktor	1010	815	981	834	667

Für jede Hauptgruppe der Probanden benutzte man nur eine GDH-Lösung, die jeweils frisch hergestellt worden war, obwohl Sobel (147) u.a. Beständigkeit bis zu 13 Monaten angeben. Somit wirkt die Streuung der Faktorengröße nicht einschränkend auf die Vergleichbarkeit der Tests einer Person (siehe 3.6.5.).

3.6.4.2. Die Carotinkorrektur

Die Farbkomplexbildung der GDH erstreckt sich wie erwähnt nicht nur auf Vitamin A (siehe Tabelle 9). Carotin reagiert zu 10 bis 20 % (Tiews 157) mit (Krennrich 87). Die abgelesene Extinktion der Probe (E_a) - nicht der Eichlösung - ist also auf Vitamin A und sein Provitamin gemeinsam zurückzuführen. (E_a) aus Gleichung (1) muß zu Ausdruck (3) erweitert werden.

$$(3) \quad E \text{ der Probe } a_{555} = E_A 555 + E_C 555 \quad \begin{array}{l} 555 = \text{Meßwellenlänge} \\ C = \text{Carotin} \end{array}$$

Diese ablesbare Probenextinktion bedarf der Bereinigung, da ja die nur auf Vitamin A beruhende Extinktion gesucht wird (Formel 4).

$$(4) E_A 555 = E \text{ der Probe}_a 555 - E_C 555$$

Der Korrektur liegt folgender Gedankengang zugrunde: Von der für Carotin bei 480 μ m im Benzinextrakt gemessenen Extinktion kann auf die Carotinkonzentration der Probe geschlossen werden, da Ausdruck (5) gilt:

$$(5) \text{Konzentration an C} = E_C 480 \cdot F_C 480 \quad 480 = \text{Meßwellenlänge (IE/100 ml Serum)}$$

Für die erhaltene Konzentration an Provitamin kann die zugehörige Extinktion mit GDH bei 555 μ m berechnet werden (Gleichung 6), denn es gilt die Beziehung (7).

$$(6) E_C 555 = \text{Konzentration an C} : F_C 555$$

$$(7) \text{Konzentration an C} = F_C 555 \cdot E_C 555$$

Formel (7) kann in (5) eingesetzt werden, die linken Seiten sind identisch. Es resultiert Gleichung (8).

$$(8) F_C 555 \cdot E_C 555 = F_C 480 \cdot E_C 480$$

Gesucht wird $E_C 555$; also löst man zu Ausdruck (9) auf.

$$(9) E_C 555 = (F_C 480 \cdot E_C 480) : F_C 555$$

Die beiden Faktoren $F_C 480$ und $F_C 555$ besitzen Konstanz und sind zu einer neuen Größe zusammenfaßbar (Formel 10).

$$(10) F_C 480 : F_C 555 = F_K \quad K = \text{Korrektur}$$

Aus Formel (9) wird durch Einsetzen von (10) Gleichung (11).

$$(11) E_C 555 = E_C 480 \cdot F_K$$

Diese Formel ist in Ausdruck (4) einzufügen (Gleichung 12).

$$(12) E_A 555 = E_a 555 - F_K \cdot E_C 480$$

Jetzt entsteht die korrigierte, allein durch Vitamin A verursachte Extinktion, die in die Vitaminkonzentrationen umgerechnet werden kann (Gleichung 13).

$$(13) \text{ Vitamin A-Konzentration} = (E_{a \ 555} - F_K \cdot F_{C \ 480}) \cdot F_A \\ (\text{IE}/100 \text{ ml Serum})$$

Die nötigen Faktoren entnahm man nachstehend dargestellten Eichgängen.

3.6.4.2.1. Carotineichkurve bei 480 μm

Die Stammlösung bestand aus 2 γ Carotin/ml Benzin. Die Standardreihe besaß für 200 ml die Konzentration 160 γ , 200 γ , 240 γ , 260 γ . Diese 200 ml Benzinlösung entsprechen 100 ml Serum, da das Carotin im Analysengang in der Verdünnung 1 : 2 gemessen wird (3 ml Serum, aber 6 ml Benzinextrakt). Die Standardreihe wurde bei 480 μm gemessen und aus vier bis fünf Parallelmessungen der Mittelwerte gebildet.

Der Eichfaktor $F_{C \ 480}$ entsteht aus der Beziehung (14), die aus Formel (5) abgeleitet wurde.

$$(14) E_{C \ 480} : \text{Konzentration an C} = F_{C \ 480}$$

Die linke Seite der Gleichung war aufgrund der Eichkurve für Carotin, gemessen bei 480 μm , bekannt.

Der Eichfaktor $F_{C \ 480}$ betrug 400.

3.6.4.2.2. Eichung der Carotin-GDH-Reaktion

Auf die direkte Berechnung der Provitamingehalte im Serum wurde verzichtet und sogleich $F_{C \ 555}$ bestimmt, damit Gleichung (10) ausgerechnet werden konnte.

Für die Eichkurve wurde der Bestimmungsvorschrift entsprechend das carotinhaltige Benzin abgedampft, mit 0,5 ml Chloroform aufgenommen, mit 2 ml GDH angefärbt und bei 555 μm gemessen. Aus der Stammlösung stellte man die Standardreihe mit 240 γ , 260 γ , 390 γ , 650 γ Carotin auf 200 ml Benzin (bzw. 100 ml Serum) auf.

Da der Carotinfaktor bei 555 μm GDH-abhängig ist, sind fünf Werte anzugeben (Tabelle 42).

Tabelle 42 Die Carotin-GDH-Faktoren ($F_C 555$)

GDH-Ansatz	I	II	III	IV	V
Faktor	2 593	2 092	2 518	2 141	1 712

3.6.4.2.3. Der Korrekturfaktor

Die linke Seite von Ausdruck (10) (also $F_C 480$ und $F_C 555$) ist jetzt bekannt, die Korrektur kann ermittelt werden. (Tabelle 43).

Tabelle 43 Die Korrekturfaktoren (F_K)

GDH-Charge	I	II	III	IV	V
Faktor	0,154	0,191	0,159	0,187	0,234

Damit ist die rechte Hälfte von Gleichung (12) bestimmt, es wird in nächster Stufe die bereinigte Extinktion ($E_A 555$) ermittelt. Dann endlich kann anhand von Formel (13) der Vitamingehalt in 100 ml Serum ausgerechnet werden.

3.6.4.2.4. Zusammenfassung

Tabelle 44 zeigt die zur Umrechnung der von einer Probe abgelesenen Extinktionen auf die Konzentration in 100 ml Serum nötigen Faktoren (F_K betrug 400).

Tabelle 44 Die Umrechnungsfaktoren

Charge der GDH	F_A	F_K
I	1 010	0,154
II	815	0,191
III	981	0,159
IV	834	0,187
V	667	0,234

3.6.5. Die Kontrolle der GDH-Aktivität

Es besteht die Gefahr, daß die Aktivität der GDH-Lösung mit zunehmender Verwendungsdauer nachläßt, auch wenn sie lichtgeschützt bei niedrigen Temperaturen aufbewahrt wurde. Darum

wurde in jeder Versuchsreihe frisch angesetzte GDH-Lösung verwendet (vergleiche 3.6.4.1.). Durch wiederholte Standardanalysen überprüfte man, ob ihre Aktivität nachgelassen hatte. Dazu wurden bei der Eichung des GDH-Ansatzes von einer Standardkonzentration 5 ml-Portionen abgenommen (Lagerbedingungen: -18°C unter Stickstoff).

Es zeigten sich innerhalb der vierwöchigen Verwendungsperiode Extinktionsabweichungen von weniger als 0,005. Die Aktivität war praktisch gleich geblieben.

3.6.6. Methodengenauigkeit

Um zu ermitteln, welche Abweichungen bei Doppelbestimmungen aus demselben Serum auftraten, wurden die Nüchternwerte der ersten Belastung (intravenöse Injektion von Substanz D) und des letzten Tests (Emulsion C) der statistischen Analyse unterworfen (Tabelle 45).

Tabelle 45 Überprüfung der Methodengenauigkeit anhand von Nüchternwerten

1. Die Werte vor der Belastung mit Präparat C

Pro-band	Vitamingehalt (IE/100 ml Serum)			Varianz s^2	Standard- abwei- chung (s)
	gemessene Einzel- werte		arithmeti - sches Mittel $\bar{x}$		
	1	2			
1	215	225	220	50	7,0710
2	263	272	267,5	40,5	6,3639
3	241	251	246	50	7,0710
4	231	232	231,5	0,5	0,7071
5	253	250	251,5	4,5	2,1213
6	202	209	205,5	24,5	4,9497
7	228	229	228,5	0,5	0,7071
8	229	232	230,5	4,5	2,1213
9	236	244	240	32	5,6568
10	261	261	261	0	0
11	264	272	268	32	5,6568
12	205	209	207	8	2,8284

Fortsetzung Tabelle 45

13	275	279	277	8	2,8284
14	253	254	253,5	0,5	0,7071
15	251	251	251	0	0
16	256	265	250,5	40	6,3639
17	207	207	207	0	0
18	224	224	224	0	0
19	208	212	210	8	2,8284
20	163	171	167	32	5,6568
Mittelwerte				16,8	4,0987

2. Die Daten vor der intravenösen Injektion von Substanz D

1	269	269	269	0	0
2	240	250	245	50	7,0710
3	225	235	230	50	7,0710
4	238	238	238	0	0
5	207	206	206,5	0,5	0,7071
6	225	229	227	8	2,8284
7	260	253	256,5	24,5	4,9497
8	225	223	224	2	1,4142
9	210	213	211,5	4,5	2,1213
10	202	209	205,5	24,5	4,9497
11	217	220	218,5	4,5	2,1213
12	246	252	249	18	4,2426
13	236	234	235	2	1,4142
14	202	203	202,5	0,5	0,7071
15	275	270	272,5	12,5	3,5355
16	267	275	271	32	5,6568
17	183	183	183	0	0
18	205	208	206,5	4,5	2,1213
19	147	150	148,5	4,5	2,1213
20	147	154	150,5	24,5	4,9497
Mittelwerte (einschließlich Tab. 45,1)				15,07	3,8826

Es ergibt sich eine Standardabweichung von 3,8 und 4. Die analysenbedingten Schwankungen liegen also unter 10 %.

3.7. Die Auswertung

Das Resultat der chemischen Analyse waren Serumkonzentrationskurven im Zeitablauf von 24 Stunden. Unter 1.2.1. wurde bereits der Weg, auf dem die Diagramme verglichen wurden, angedeutet.

3.7.1. Die Ermittlung der Resorptionsquoten mit Hilfe der Pharmakokinetik

Um die Methode der pharmakokinetischen Auswertung klarzulegen, werden die theoretischen Grundlagen (Dost 31) zusammengefaßt.

3.7.1.1. Begriffserklärung

Die Definition von "Pharmakokinetik" geht von der Wortzusammensetzung aus. Ein Pharmakon ist ein Medikament, d.h. eine Substanz, die zur Veränderung oder Erforschung physiologischer Systeme oder pathologischer Zustände zum Wohle des Empfängers dient oder deren Benutzung in diesem Sinne beabsichtigt ist (WHO 166). Unter Kinetik versteht man die Beschreibung des zeitlichen Ablaufs und der Geschwindigkeit von Vorgängen. Pharmakokinetik wäre danach die Beschreibung des zeitlichen Ablaufs und der Geschwindigkeit von den Vorgängen im Organismus, die durch einen zugeführten Stoff hervorgerufen oder beeinflußt werden. Die klassische Definition (Dost 31 und 34) lautet: Pharmakokinetik ist die Lehre von der quantitativen Auseinandersetzung zwischen Organismus und einverleibtem Pharmakon. Ausführlicher ausgedrückt ist sie das Studium von Absorption, Verteilung, Stoffwechsel und Ausscheidung von Medikamenten (WHO 166).

3.7.1.2. Grundlagen

1. Jeder Stoff, den ein Organismus aufnimmt, besitzt eine typische Affinität zu den einzelnen Geweben und Organen. Er

verteilt sich innerhalb des Organismus auf einen spezifischen Raum (Dost 23). Dieser Raum - das Verteilungsvolumen - ist eine Modellvorstellung; er muß nicht anatomisch einheitlich oder eingrenzbar sein. Das Verteilungsvolumen ist stoff- und individuenspezifisch.

2. Das Verteilungsvolumen bezieht sich auf einen Standard, das Blut (Dost 31). Man geht von der Vorstellung aus, daß die Konzentration im Blut und im gesamten Verteilungsvolumen gleichgroß sei, die Blutkonzentration also die Konzentration des gesamten Verteilungsvolumens repräsentiere. Je geringer der Gehalt des verabreichten Stoffes im Blut im Verhältnis zur injizierten Dosis ist, desto größer muß das Verteilungsvolumen sein. Man schließt von der Stoffkonzentration im Blut auf diejenige im Verteilungsvolumen.

Als mathematische Beschreibung gilt Ausdruck (15) (Dost 23, 31).

V = Verteilungsvolumen

D = intravenös injizierte, bzw.
ins Blut eingetretene Dosis

$$(15) \quad V = \frac{D}{y_0} = \frac{D}{a} \quad y_0 \text{ und } a = \text{Blutspiegelkonzentration, die bei sofortiger, gleichmäßiger Verteilung der Dosis in } V \text{ auftreten würde}$$

Das Verteilungsvolumen wird auch auf das Körpergewicht bezogen (Gleichung 16) (Dost 23).

$$(16) \quad d = \frac{D}{a \cdot W} \quad \begin{array}{l} d = V/\text{kg Körpergewicht} \\ W = \text{Körpergewicht in kg} \end{array}$$

Das Verteilungsvolumen kann aus mehreren Kompartimenten (C_p) bestehen, in die sich der betrachtete Stoff verteilt (Dost 32, 33 und 35).

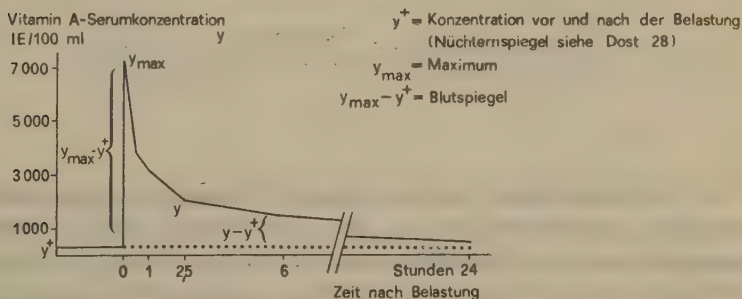
3. Der Organismus ist als ein offenes System zu betrachten, in dem die einzelnen Metaboliten in ständigem Fließgleichgewicht enthalten sind (Dost 23 und 27). Dieses für den Körper günstige Niveau ist gegenüber Störungen von außen anfällig, d.h. bei stärkerer Zufuhr steigt die Konzentration im Verteilungsvolumen über das Gleichgewichtsniveau hinaus an.

4. Das physiologische System reagiert auf diese Störung des Gleichgewichts, indem es den Überschuß irreversibel beseitigt,

eliminiert (Dost u.a. 23,32). Diese Elimination erfolgt durch Umbau, Ablagerung oder Ausscheidung (Dost 23).

Dieser Vorgang der Störung und Wiederherstellung des Gleichgewichtsniveaus (Dost 23) ist meßbar an den Konzentrationsveränderungen des betrachteten Stoffes im Bezugskompartiment, am Blutspiegelverlauf. Nach schneller intravenöser Injektion z.B. entsteht im Konzentrations-Zeit-Diagramm folgendes Bild (Abbildung 15) (siehe auch Dost 28, 30, 33, 35 u.a.).

Abbildung 15 Blutspiegelverlaufskurve nach intravenöser Injektion (168 000 IE Vitamin A-Palmitat - Präparat D - zur Zeit t_0 bei Proband 12 injiziert)



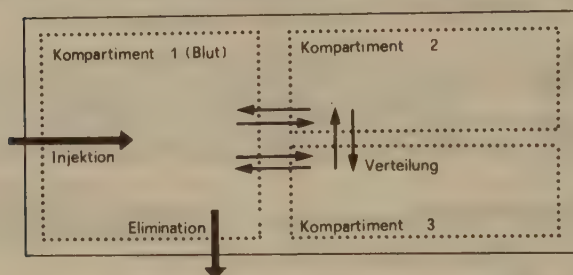
Für die Reaktion des Organismus ist nicht die absolute Höhe der Blutkonzentration nach der Zufuhr des Stoffes maßgebend (das wäre y), sondern die Differenz zum Gleichgewichtsniveau (y^+), die der Störung entspricht ($y - y^+$) (Hattingberg 61). Bei körperfremden Stoffen beträgt y^+ Null. ($y - y^+$) entspricht dann der absolut gemessenen Blutspiegelhöhe (y).

Der Abfall des Blutspiegels nach der Belastung des Organismus mit einer Substanz kann verschiedene Formen annehmen.

Im Einkompartimentenmodell (Schneider 140) ist die Blutspiegelsenkung allein Ausdruck der Elimination aus dem Verteilungsvolumen. Die Konzentrationszeitkurve verläuft nach einer einzigen e-Funktion, da die eliminierte Stoffmenge der jeweiligen Konzentration zu diesem Zeitpunkt entspricht. $y_{max} - y^+$ (aus Abbildung 15) ist dann mit a bzw. y_0 aus Formel 15 identisch.

Besteht das Verteilungsvolumen aus mehreren Kompartimenten (Definition bei Garrett 49, Schneider 140) (Abbildung 16), so entspricht der Konzentrationsverlauf einer Summe von Funktionen erster Ordnung (vergleiche Dost 33).

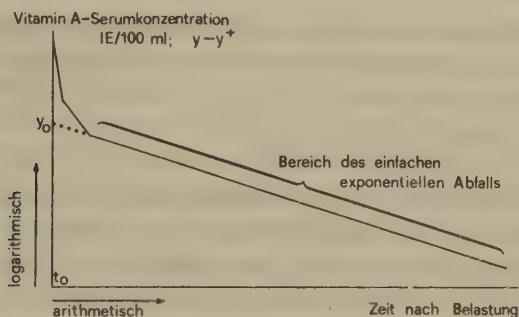
Abbildung 16 Vorgänge im Mehrkompartimentmodell
(Erklärung siehe Text)



Die Erklärung dafür bieten folgende Prozesse: Die Injektion erfolgt in Kompartiment 1. Der Blutspiegel steigt rasch erheblich an. Er fällt dann aber nicht nur durch die sofort einsetzende Elimination des Stoffes aus dem Verteilungsvolumen, sondern auch dadurch, daß der Stoff in die Kompartimente zwei und drei eintritt (Dost 23). Die Senkung des Serumgehaltes resultiert also zunächst aus Elimination und Verteilung. Sie verläuft zusammengesetzt exponentiell, d.h. sie stellt die Summe mehrerer Prozesse erster Ordnung dar. Tritt zwischen den Kompartimenten nach einiger Zeit Diffusionsgleichgewicht ein, so ist der Ausstrom von Kompartiment eins nach zwei und drei dem Einstrom gleichgroß. Damit entfällt die Wirkung der Verteilung auf den Blutspiegelverlauf (nachdem die Serumkonzentration um die in Kompartiment zwei und drei verteilte Menge vermindert wurde), der jetzt nur durch die Elimination aus dem Verteilungsvolumen bestimmt wird. In diesem Zeitraum stellt sich die Elimination als einfache e-Funktion dar. Um aus einer gemessenen Blutspiegelkurve entnehmen zu können, wann nur noch die echte Elimination stattfindet, zeichnet man

die gewonnenen Daten in ein halblogarithmisches Achsenkreuz. Die Erhöhungen ergeben, wenn sie der Bedingung des einfachen exponentiellen Abfalls folgen, eine Gerade (Abbildung 17) (Dost 26, 29).

Abbildung 17 Schematische Darstellung der Blutspiegelerhöhung im halblogarithmischen Raster



Im Multikompartimentenmodell entspricht der Höchstanstieg ($y_{\max} - y^+$) (Abbildung 15) nicht mehr y_0 von Gleichung (15), das definitionsgemäß von dem sofortigen Bestehen völlig gleichmäßiger Verteilung zwischen den Kompartimenten ausgeht (sie wird fiktive Anfangskonzentration genannt (z.B. Dost 28)). Das hier zugehörige y_0 kann graphisch (siehe Abbildung 17) oder rechnerisch (vergleiche Tabelle 48) bestimmt werden, indem der Kurventeil, der nur noch einer Funktion erster Ordnung unterliegt, auf den Applikationszeitpunkt t_0 extrapoliert wird.

Die Geschwindigkeit, mit der die Elimination aus dem Verteilungsvolumen vor sich geht, ist der jeweiligen Störung proportional, d.h. die eliminierte Stoffmenge entspricht der im gleichen Zeitpunkt überschüssigen Quantität (Ausdruck 17) (Dost 23).

$$(17) \quad - \frac{dy}{dt} = -k_2 (y - y^+)$$

Diese Formel enthält den spezifischen Faktor k_2 , die Eliminationskonstante (Dost 23, 24). Sie wird durch den Teil der Blut-

spiegelkurve nach intravenöser Injektion festgelegt, der nur noch einer e-Funktion folgt (siehe Seite 65). Dazu werden die Formeln zweier y-Werte dividiert und nach k_2 aufgelöst (Dost 23), woraus Gleichung (18) entsteht (siehe auch Dost 24).

$$(18) \quad k_2 = \frac{\ln y_1 - \ln y_2}{t_2 - t_1}$$

3.7.1.3. Ergänzung des Konzentrationsverlaufs vom Ende der Versuchsperiode bis zur Wiederherstellung des Nüchternwertes

3.7.1.3.1. Der intravenöse Test

Durch die Kenntnis der Eliminationskonstanten wird es möglich, die Konzentrationsverlaufskurve nach intravenöser Belastung über den Meßzeitraum hinaus zu berechnen, soweit bis der Serumgehalt (y) den Nüchternwert wieder erreicht hat. Es muß allerdings sichergestellt sein, daß die Eliminationskonstante aus demjenigen Kurvenabschnitt errechnet wurde, der mit einer einzigen e-Funktion beschreibbar ist (siehe oben).

3.7.1.3.2. Bei nicht intravenöser (hier oraler) Applikation

Zur Bestimmung der Blutspiegelkurve nach oraler Belastung über den experimentell erfaßten Zeitraum hinaus bedient man sich folgender Vorstellung:

Die Untersuchungszeitspanne ist groß genug zu wählen, damit gewährleistet ist, daß die für den Organismus bei gegebener Dosis insgesamt mögliche Stoffmenge gleichmäßig verteilt ins Verteilungsvolumen eingetreten ist. Die Blutspiegelkurve ist dann nur noch abhängig von der Elimination, deshalb entspricht sie einer einfachen e-Funktion. Dann liegen die Verhältnisse analog zur intravenösen Injektion. Die aus dem Test mit intravenöser Applikation berechnete Eliminationskonstante und das Verteilungsvolumen wären auf die orale Verabreichung übertragbar. Die zugehörige Kurve kann in diesem Falle bis zum Nüchternwert extrapoliert werden.

3.7.1.4. Die Fläche als Ausdruck des aufgenommenen Anteils

Die Bedeutung der auf diese Weise ermittelten Gesamtfläche und eine weitere Begründung für die Berechtigung der oben dargelegten Übertragbarkeit von Daten, die aus intravenösen Belastungen entstanden, auf Tests mit oraler Verabreichung wird im "Gesetz der korrespondierenden Flächen" (Dost 25) verdeutlicht.

Aufgrund statistischer Überlegungen zum Umsatz eines Stoffes im Blut fand Dost (25, 27), daß die statistische mittlere Lebensdauer, bzw. die Umsatzzeit einer bestimmten, ins Blut eingetretenen Dosis für eine Person gleichbleibend ist, unabhängig davon, auf welchem Wege sie in die Kreislaufflüssigkeit gelangte (intravenöse Injektion oder z.B. Resorption aus dem Darmlumen). Eine Dosis, die ins Blut eintritt, verursacht immer die gleiche Störung des zuvor bestehenden Gleichgewichts. Die Blutspiegelveränderung (bezogen auf die Zeit) ist konstant, d.h. die Fläche unter der Konzentrationsverlaufskurve ist gleichgroß (das ist die Aussage des Gesetzes der korrespondierenden Flächen). Differenzen zwischen der Fläche im Diagramm der intravenösen Gabe und der oralen Belastung wären demnach durch eine geringere ins Blut eingetretene Stoffmenge nach oraler Applikation begründet, d.h. unvollständige Resorption (Dost 28).

Der Umsatz, mithin auch die Blutspiegelveränderung und die Fläche im Konzentrations-Zeit-Diagramm sind proportional der im Blut vorhandenen Dosis (Dost 28, 29, 33) (Ausdruck 19).

$$(19) \text{ Fläche} \cdot \text{Konstante} = \text{Dosis}_{\text{resorbiert}}$$

Um zu ermitteln, welcher Anteil einer oral zugeführten Dosis ins Blut eingetreten ist, beschreibt Dost zwei Wege:

1. Nach Injektion einer bekannten Quantität ins Blut wird die Fläche unter der sich ergebenden Blutkonzentrationsverlaufskurve bestimmt. Die gleiche Dosis wird daraufhin oral verabreicht. Der Vergleich der hieraus resultierenden Flächen mit denen nach intravenöser Gabe ergibt den ins Blut aufgenommenen Anteil der oral zugeführten Dosis (Dost 28, 29, 33, experimenteller Nachweis: Gladtko 53).

2. Die im Blut nach oraler Zufuhr aufgetretene Menge kann auch direkt bezogen auf die verabreichte Dosis bestimmt werden. Wie oben ausgesagt, ist die Fläche dem Umsatz der Dosis im Blut proportional. Der Umsatz ist über das Volumen der Körperflüssigkeit faßbar, das die eliminierenden Organe pro Zeiteinheit durchströmt und dabei den betrachteten Stoff völlig abgibt. Diese Flüssigkeitsmenge bezeichnet man als totale Clearance (Cl_{tot}) (Dost 29). Die Fläche wird mit dieser Größe multipliziert und es ergibt sich daraus die Dosis, die im Blut enthalten war (Formel 20) (Dost 29).

$$(20) \quad \text{Fläche} \cdot Cl_{tot} = \text{Dosis}_{\text{resorbiert}}$$

Dann kann durch Division der resorbierten Dosis durch die applizierte Dosis (D_{appl}) (21) der resorbierte Anteil erfaßt werden.

$$(21) \quad \frac{D_{res}}{D_{appl}} \cdot 100 = \text{resorbierter Anteil}$$

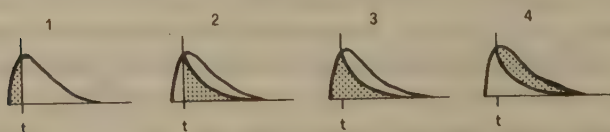
Um die Clearance zu ermitteln, geht man von intravenöser Injektion des Stoffes aus, bestimmt die Eliminationskonstante und das Verteilungsvolumen, welche miteinander multipliziert die Clearance ergeben (Formel 22) (Dost 31).

$$(22) \quad Cl_{tot} = V \cdot k_2$$

3.7.1.5. Mengenbeziehungen der applizierten Dosis

Die im Belastungstest verabreichte Dosis läßt sich durch Fraktionierung in folgende Anteile, die durch Teilflächen repräsentiert werden (Dost 33, 36, 37), trennen.

Abbildung 18 Die den Teilmengen des untersuchten Stoffes entsprechenden Teilflächen
(Dost 36) (Erklärung siehe Text)



1. Transit (T_s) heißt die Menge eines Stoffes, die nach nicht intravenöser, für den vorliegenden Fall also oraler Applikation bis zum Meßzeitpunkt ins Blut des großen Kreislaufs eingetreten ist und es wieder verlassen hat. Dieser Teil einer Blutspiegelkurvendarstellung nach oraler Applikation muß durch Bildung von Teilflächen mittels Dreiecks- und Trapezformel (vergleiche 1.2.1.(4)) errechnet werden (Dost 36).

2. Occupancy stellt die Stoffmenge dar, die bis zum Zeitpunkt t ins Blut eingetreten und noch in ihm enthalten ist (Dost 35, 37). Man könnte davon ausgehen, daß zu dem gewählten Zeitpunkt t keine weitere Substanz ins Blut eintritt und lediglich die vorhandene eliminiert wird. Dann entspricht das den Verhältnissen nach intravenöser Belastung und das dort bezüglich des Konzentrationsabfalls im Blut beschriebene kann auf den Test mit oraler Zufuhr übertragen werden.

Legt man den Meßzeitpunkt auf das Ende der Untersuchungsperiode, so kann errechnet werden, welche Stoffmengen noch im Blut enthalten sind. Außerdem läßt sich die Kurve soweit vervollständigen, daß sie sich wieder mit dem Nüchternwert trifft.

3. Transit ergibt zusammengekommen mit Occupancy den Transfer (T_f) (Dost 30, 32, 36). Diese Bezeichnung beschreibt den gesamten Dosisanteil, der ins Blut aufgenommen wurde. Er ist teilweise eliminiert (Transit), teilweise noch enthalten (Occupancy) (Dost 30). Der Transfer entspricht der Resorption (Dost 35).

4. Die noch zum Eintritt ins Blut bereitstehende Stoffmenge wird als Availment (A_v) bezeichnet (Dost 35, 37).

3.7.1.6. Schlußfolgerungen für die Versuchsanordnung

Um die pharmakokinetische Methode anwenden zu können, mußten in einer intravenösen Belastung die Werte für das Verteilungsvolumen und die Eliminationskonstante bestimmt werden. Daraufhin konnte der Untersuchungszeitraum der oralen Belastungen über den letzten experimentell ermittelten Wert (dem 24-Stunden-Wert) hinaus verlängert werden, bis die Blutkonzentrationsveränderung bezogen auf den Nüchternwert Null betrug. Das entspricht der Berechnung von Occupancy für den 24-Stunden-Wert.

Auf diese Weise ergab sich die Gesamtfläche unter der Konzentrationsverlaufskurve, die als Grundlage der Errechnung des aufgenommenen Anteils der oral zugeführten Dosis diente.

3.7.1.7. Durchführung der Berechnung am Tischrechner

Der zur Verfügung stehende Rechner enthielt ein Programm, das nach dem hier erläuterten Modell die Werte für die Eliminationskonstante und das Verteilungsvolumen aus den Serumkonzentrationen (Tabelle 46) der intravenösen Belastung errechnete (Tabelle 48). Ein weiteres Programm gestattete die Transferbestimmung, sowie die Berechnung des resorbierten Anteils (Tabelle 49).

3.7.1.7.1. Berechnung der Daten des Verteilungsvolumens und der Eliminationskonstanten aus dem Test mit intravenöser Applikation

Zur Durchführung des Programms mußten dem Rechner nachstehende Werte eingegeben werden:

1. Das Gewicht (W) der Probanden (siehe Tabelle 27),
2. die verabreichte Gesamtdosis ($D_{\text{appl.}}$) (siehe Tabelle 31),
3. die Nüchternkonzentrationen (y^+) (vergleiche Tabelle 46,1) und
4. die Serumkonzentrationen (y) im Bereich des einfachen exponentiellen Abfalls, welcher aufgrund graphischer Ermittlung 2,5 Stunden nach der Applikation begann (siehe 4.2.), mit den zugehörigen Zeitabständen zur Applikation (siehe Tabelle 46,1).

Er bestimmte dann:

1. Die verabreichte Dosis, bezogen auf das Gewicht ($\frac{D_{\text{appl.}}}{W}$) (siehe Tabelle 32),
2. die fiktive Anfangskonzentration ($y_0 - y^+$) (siehe Tabelle 48),
3. die Eliminationskonstante (k_2) (Tabelle 48) und
4. das Verteilungsvolumen, bezogen auf das Körpergewicht (d) (Tabelle 48).

3.7.1.7.2. Die Resorptionsquoten der oral verabreichten Dosen

Die Daten, die dieses Programm als bekannt voraussetzt - das Gewicht, die verabreichte Dosis, die Eliminationskonstante, das Verteilungsvolumen je kg Körpergewicht und die Blutserumkonzentrationen mit den entsprechenden Zeiten -, lagen durch die erste Berechnung vor.

Der Rechner lieferte daraufhin (Tabelle 49):

1. Nochmals die Dosis pro kg Gewicht (diese ist in Tabelle 32 angegeben),
2. die totale Clearance,
3. den Transit,
4. den Transfer,
5. die absolut im Blut erschienene Dosis und
6. die aufgenommene Menge als Anteil der applizierten Dosis.

Da die letzten vier Größen für alle Zwischenwerte errechnet wurden, diese aber bei dem zutreffenden Multikompartimentmodell nicht ausgewertet werden können, sind nur die Daten für den 24-Stunden-Wert aufgeführt.

Die aufgenommene Menge als resorbierter Anteil, basierend auf dem 24-Stunden-Wert, bildet die Grundlage der statistischen Auswertung.

3.7.2. Die statistische Bewertung und weitere Beurteilung

Da das Ziel der Untersuchung ein Vergleich der Aufnahmequoten der Präparate war, mußten alle anderen Einflüsse ausgeschaltet werden. Wie unter 2.1.3.1. (i) angesprochen, vermeidet man die Mitbewertung der individuellen Schwankungen, indem die drei Resorptionsquoten eines Probanden zunächst unter sich verglichen werden und dann erst der Unterschied zwischen den einzelnen Personen betrachtet wird. Die statistische Analyse baut aus diesem Grund auf der Differenz der resorbierten Anteile bei jeder Versuchsperson auf. Es entsteht ein Paarvergleich zwischen je zwei Präparaten (Tabelle 54).

Die geschmackliche Bewertung der Präparate durch die Versuchsteilnehmer geht in die Bewertung mit ein. Die protokollierten Ernährungsgewohnheiten (Tabelle 28) und Mahlzeiten an den Testtagen werden mit beachtet.

4. Die Ergebnisse

Aus den Auswertungsschritten ergeben sich an einzelnen Ergebnissen:

Blutspiegelkurven,
resorbierte Anteile,
Differenzen der Resorptionsquoten,
statistische Beurteilung und
weitere Bewertung.

4.1. Ergebnisse aus den chemischen Analysen der Blutproben

4.1.1. Die Konzentrationsverläufe im Blutserum

Aus jedem Belastungstest entstand eine Blutkonzentrationsverlaufskurve. Die aufgrund der chemischen Bestimmung im Serum (siehe 3.6.) gemessenen Extinktionen ergaben nach Korrektur und Umrechnung (vergleiche 3.6.) Serumkonzentrationen an Vitamin A. Diese Daten gibt Tabelle (46) wieder.

Tabelle 46 Blutspiegelwerte (IE/100ml Serum)

1. Nach intravenöser Injektion von 168 000 IE Retinylpalmitat (Präparat D)

Pro-band	Zeit nach Belastung						
	Minuten			Stunden			
	0	5	30	1	2,5	6	24
1	269	7 744	5 613	3 885	2 269	1 583	418
2	245	8 350	6 592	5 017	3 345	2 411	628
3	230	8 472	6 452	5 391	3 620	2 674	450
4	238	8 248	7 288	6 177	4 490	2 824	545
5	207	6 210	4 694	3 676	2 070	1 646	225
6	226	5 897	4 316	3 493	2 629	1 577	271
7	257	5 257	3 913	3 293	2 130	1 363	360
8	225	5 643	3 174	2 766	1 974	1 431	359
9	211	6 883	4 626	3 868	1 747	1 415	302
10	206	6 771	5 108	4 246	2 411	1 832	444
11	219	7 390	6 522	5 629	3 478	2 060	456
12	249	7 114	3 960	3 178	2 086	1 509	435

Fortsetzung Tabelle 46

13	236	7 272	4 804	3 895	2 392	1 927	405
14	203	6 323	4 309	3 801	1 921	1 528	301
15	272	9 934	6 358	4 307	2 235	1 621	508
16	270	7 721	4 485	3 868	2 220	1 508	442
17	183	6 610	4 522	3 262	1 760	1 247	432
18	206	6 823	5 649	4 868	2 921	1 982	681
19	149	6 107	4 476	3 512	2 138	1 331	372
20	150	7 278	3 589	2 680	1 976	1 459	408

2. Nach oraler Belastung mit 165 000 IE Vitamin A Palmitat in Öl (Präparat A)

Pro-band	Zeit nach Belastung (Stunden)					
	0	1,5	2,5	3,5	6	24
1	243	375	433	551	991	372
2	233	579	836	1 503	2 230	331
3	247	1 475	2 502	2 941	2 214	319
4	270	1 501	2 010	2 304	1 157	357
5	198	387	469	738	1 298	324
6	227	1 266	1 303	848	830	250
7	279	1 000	972	947	1 127	357
8	276	2 872	1 915	1 762	883	318
9	259	280	462	686	605	349
10	252	1 278	803	745	1 408	335
11	248	1 785	1 616	876	837	314
12	263	1 915	3 320	2 456	835	504
13	256	2 110	3 246	2 796	1 231	493
14	233	496	635	696	1 399	408
15	249	259	1 314	1 152	1 491	474
16	257	537	590	694	2 342	548
17	226	772	780	800	621	351
18	250	623	1 363	1 493	2 014	470
19	197	700	758	980	614	322
20	164	2 088	2 655	2 030	830	358

3. Nach oraler Applikation von 168 000 IE Vitamin A-Palmitat als Emulsion (Präparat B)

Pro-band	Zeit nach Belastung (Stunden)					
	0	1,5	2,5	3,5	6	24
1	256	1 950	1 975	1 487	921	293
2	268	2 357	3 034	2 595	1 385	400
3	243	1 962	2 893	2 381	1 610	327
4	257	1 303	2 089	1 683	1 009	261
5	262	2 649	2 722	2 563	930	327
6	210	1 535	1 315	1 092	579	280
7	245	1 199	1 083	865	610	351
8	273	1 985	2 420	1 682	1 042	306
9	263	1 993	1 783	1 545	1 032	320
10	280	2 466	1 819	1 642	1 022	317
11	255	3 567	2 311	1 454	856	339
12	225	4 282	5 137	3 817	1 952	558
13	253	2 672	3 188	2 574	922	463
14	227	1 552	1 919	1 873	1 223	413
15	263	3 128	2 607	1 744	1 295	405
16	273	2 002	1 168	1 020	759	424
17	212	1 507	1 571	1 366	852	333
18	218	1 990	2 000	1 704	750	424
19	178	2 120	2 383	2 020	1 009	382
20	169	2 690	2 383	1 576	724	368

4. Nach oral verabreichtem Vitamin A-Palmitat (168 000 IE, Emulsion C)

Pro-band	Zeit nach Belastung (Stunden)					
	0	2	3	4,5	6	24
1 ⁺	220	1 685	553	548	436	301
2 ⁺	268	533	836	1 644	957	386

⁺Bei Proband 1 und 2 erfolgten die ersten beiden Blutabnahmen nach der Belastung nach 1,5 und 2,5 Stunden

Fortsetzung Tabelle 46,4

3	246	1 842	2 211	3 018	2 105	329
4	231	2 137	2 009	1 508	1 064	312
5	253	1 005	764	833	698	318
6	206	1 572	1 526	1 031	819	252
7	229	1 108	905	996	719	346
8	230	2 751	2 296	1 180	878	297
9	240	2 347	2 362	1 778	1 412	252
10	261	1 845	1 315	1 194	773	343
11	269	1 268	2 580	2 010	1 111	326
12	207	3 110	2 509	1 922	1 292	465
13	276	2 690	2 919	1 739	992	473
14	253	2 028	1 850	1 369	982	441
15	251	3 484	3 027	2 213	1 592	461
16	261	1 737	989	898	698	516
17	207	1 291	1 187	1 086	709	333
18	224	2 293	2 306	1 543	1 009	408
19	210	2 428	2 314	1 361	686	313
20	167	2 293	1 376	870	462	285

4.1.2. Nüchternwerte und Präparatreihenfolge

Da die Testsubstanzen in festgelegter Reihenfolge verabreicht wurden, könnte der Einwurf erhoben werden, daß durch die hohen Dosen die Möglichkeit veränderter Körperreserven und damit sich verschiebender Kinetik nicht ausgeschlossen werden kann. Eine Übertragung der pharmakokinetischen Größen aus dem intravenösen Test auf drei Belastungen hintereinander wäre dann unzulässig. Einige Literaturarbeiten (z.B. Barnes 3) geben ausdrücklich die wechselnde Folge der Testsubstanzen an.

Zur Prüfung dieser Sachverhalte wurden im Rahmen der Auswertung die Nüchternwerte der letzten Untersuchung (Präparat C) und der ersten (Präparat D) (Tabelle 45) statistisch verglichen. Dafür benutzte man das bereits zur Überwachung der Methodengenauigkeit aufbereitete Material (Tabelle 45) und verglich die

Standardabweichung und die Varianz der Nüchternwerte und die Streuung der Werte, die sich aus dem Vergleich der beiden Belastungsreihen ergaben (Tabelle 47).

Tabelle 47 Die Streuungsmaße der Nüchternwerte aus den Versuchsreihen mit Präparat C und D

		s^2	s
Streuung der Nüchternwerte unter sich	Präparat C	1 511,32	38,8757
	Präparat C und D	1 987,89	44,5858
Streuung der Standardabweichung und Varianz der Nüchternwerte der beiden Serien		3 302,45	57,4669

Es ergab sich, daß die Streuung zwischen den beiden Reihen größer als die innerhalb derselben ist. Es kann somit keine Einwirkung der hohen Belastungsdosen auf das Nüchternniveau im Serum nachgewiesen werden.

4.2. Zwischenergebnisse aus dem Rechenprogramm

Wie unter 3.7.1.7. dargestellt konnte die Berechnung an einem Rechner durchgeführt werden.

Die graphische Darstellung der Blutspiegelveränderungen im halblogarithmischen Raster hatte einfachen exponentiellen Abfall ab 2,5 Stunden nach der Injektion ergeben. Die Eliminationskonstante und das Verteilungsvolumen pro kg Gewicht wurden aus den 2,5-, 6- und 24-Stundenwerten errechnet.

4.2.1. Die pharmakokinetischen Größen

Die Tabellen 48 und 49 geben die Resultate des ersten Rechenprogramms wieder.

Tabelle 48 Die Werte für die fiktive Anfangskonzentration, die Eliminationskonstante und das Verteilungsvolumen je Gewichtseinheit (gültig erst ab 2,5 Stunden nach der Dosierung)

Pro-band	fiktive Anfangs-konzentration (IE/100 ml)	Eliminations-konstante	Verteilungs-volumen (l/kg)
1	2 708	0,1208	0,0885
2	3 915	0,0969	0,0498
3	4 967	0,1294	0,0520
4	5 563	0,1209	0,0444
5	4 188	0,2250	0,0607
6	3 963	0,1863	0,0605
7	2 549	0,1339	0,0813
8	2 419	0,1203	0,0952
9	2 634	0,1399	0,0981
10	2 945	0,1045	0,0760
11	4 094	0,1192	0,0774
12	2 392	0,1064	0,1032
13	3 174	0,1215	0,0801
14	2 674	0,1369	0,0860
15	2 471	0,0979	0,0849
16	2 506	0,1118	0,0893
17	1 860	0,0841	0,1087
18	3 086	0,0785	0,0766
19	2 351	0,0987	0,0965
20	2 275	0,0907	0,1070

Tabelle 49 Clearance, Transit, Transfer und aufgenommene Menge der oral verabreichten Dosis (die Zeilen untereinander entsprechen der Präparatreihenfolge A, B, C)

Pro-band	Clearance (ml/kg·h)	Transit (IE/ml·h)	Transfer (IE/ml·h)	aufgenommene Dosis	
				absolut (IE/kg)	relativ zur Zufuhr ⁺
1	0,0106	97,7720	108,4508	1,1593	0,4918
		130,7550	133,8179	1,4305	0,5960
		56,8125	63,5177	0,6790	0,2829
2	0,0048	245,9176	256,0312	1,2353	0,6438
		223,2328	236,8551	1,1428	0,5850
		114,3150	126,4925	0,6103	0,3124
3	0,0067	297,4278	302,9919	2,0385	0,8030
		233,0800	239,5714	1,6118	0,6236
		278,8050	285,2192	1,9189	0,7424
4	0,0053	168,5025	175,6985	0,9429	0,3886
		133,7900	134,1208	0,7198	0,2913
		158,4775	165,1772	0,8865	0,3588
5	0,0136	138,6125	144,2125	1,9695	0,7878
		168,1504	171,0392	2,3358	0,9176
		75,6050	78,4938	1,0719	0,4211
6	0,0112	96,0325	97,2670	1,0962	0,4650
		87,6430	91,4004	1,0301	0,4292
		113,1824	115,6515	1,3035	0,5431
7	0,0108	116,8833	122,7086	1,3358	0,6557
		78,1075	86,0238	0,9364	0,4515
		98,4650	107,2028	1,1670	0,5626
8	0,0114	142,7403	146,2316	1,6746	0,7409
		149,2528	151,9960	1,7406	0,7563
		147,1000	152,6694	1,7483	0,7597
9	0,0137	53,3300	59,7631	0,8201	0,3231
		150,1025	156,1067	2,1424	0,8289
		196,5500	197,4077	2,7092	1,0482

Fortsetzung Tabelle 49

Pro- band	Clearance (ml/kg·h)	Transit (IE/ml·h)	Transfer (IE/ml·h)	aufgenommene Dosis	
				absolut (IE/kg)	relativ zur Zufuhr ⁺
10	0,0079	152,9225	160,8650	1,2775	0,5807
		145,9350	149,4756	1,1871	0,5299
		108,2300	116,0768	0,9218	0,4115
11	0,0092	110,1950	115,7319	1,0677	0,3429
		152,1050	159,1519	1,4683	0,4632
		157,2125	161,9943	1,4945	0,4714
12	0,0109	147,1325	160,5723	1,7630	0,7266
		308,4175	321,3874	3,5288	1,4283
		181,9725	187,7995	2,0620	0,8346
13	0,0097	218,7925	238,2986	2,3191	0,9276
		187,6775	204,9614	1,9946	0,7836
		178,7325	194,9464	1,8972	0,7453
14	0,0117	150,8550	163,6380	1,9265	0,8523
		181,1175	194,7040	2,2922	0,9960
		151,3250	165,0576	1,9432	0,8443
15	0,0083	174,1325	197,1151	1,6382	0,7942
		203,7300	218,2345	1,8137	0,8636
		252,8425	270,1050	2,2448	1,0689
16	0,0099	254,3800	280,4086	2,7993	1,2724
		106,8909	120,3972	1,2019	0,5365
		106,3525	129,1610	1,2894	0,5756
17	0,0091	74,1475	89,0107	0,8136	0,4092
		126,4625	140,8501	1,2875	0,6360
		101,9800	116,9621	1,0691	0,5282
18	0,0060	238,1550	266,1804	1,6005	0,6887
		139,0450	165,2870	0,9938	0,4200
		169,9425	193,3819	1,1628	0,4914
19	0,0095	79,5925	92,2571	0,8786	0,3940
		182,0975	202,7661	1,9311	0,8506
		132,5150	142,9506	1,3614	0,5996

Fortsetzung Tabelle 49

Pro-band	Clearance (ml/kg·h)	Transit (IE/ml·h)	Transfer (IE/ml·h)	aufgenommene Dosis	
				absolut (IE/kg)	relativ zur Zufuhr ⁺
20	0,0097	167,3400	188,7291	1,8314	0,7658
		153,0725	175,0129	1,6983	0,6975
		96,9300	109,9399	1,0668	0,4381

⁺Die applizierte Dosis sei eins.

Eine Erklärung für die Werte in der Rubrik "aufgenommene Dosis relativ zur Zufuhr", die über eins liegen, liegt in der Flächenbegrenzungsmethode. Unter 1.2.1.(4) wurde erläutert, daß zur Vermeidung unkontrollierbarer Schwankungen die Meßdaten linear verbunden werden. Für Proband 16 (Präparat A) entsteht dann die in Abbildung (19) dargestellte Kurve, die sehr wahrscheinlich nicht dem physiologischen Konzentrationsverlauf entspricht, sondern nach der sechsten Stunde zu hoch liegt. Die Fläche wird daraufhin zu groß, der resorbierte Anteil übersteigt den nach der Zufuhr zu erwartenden Wert.

Abbildung 19 Blutkonzentrationsverlauf von Proband 16 nach Präparat A



4.2.2. Vergleich von Transit und Transfer

Um die Notwendigkeit zu verdeutlichen, daß die gesamte Fläche von t_0 bis zu dem Zeitpunkt, da die Konzentrationsverlaufskurve die Nüchternwertlinie wieder schneidet, berechnet werden muß, wurde die Differenz zwischen Transfer und Transit, d.h. Occupancy für t_{24} bestimmt (Tabelle 50).

Tabelle 50 Occupancy für den Zeitpunkt t_{24} (Prozentangabe: Occupancy als Teil von Transit)

Pro-band	Präparat					
	A		B		C	
	IE/ml·h	%	IE/ml·h	%	IE/ml·h	%
1	10,6788	10,9221	3,0629	2,3424	6,7052	11,8023
2	10,1136	4,1125	13,6223	6,1022	12,1775	10,6515
3	5,5641	1,8707	6,4914	2,7850	6,4142	2,3006
4	7,1960	4,2705	0,3308	0,2472	16,6997	10,5375
5	5,6000	4,0400	2,8888	1,7179	2,8888	3,8209
6	1,2355	1,2855	3,7574	4,2871	2,4691	2,1815
7	5,8253	4,9838	7,9163	10,1351	8,7378	8,8740
8	3,4913	2,4459	2,7432	1,8379	5,5694	3,7861
9	6,4331	12,0628	6,0042	4,0000	0,8577	0,4363
10	7,9425	5,1938	3,5406	2,4261	7,8468	7,2501
11	5,5369	5,0246	7,0469	4,6329	4,7818	3,0416
12	13,4398	9,1344	12,9699	4,2053	5,8270	3,2021
13	19,5061	8,9153	17,2839	9,2093	16,2139	9,0716
14	12,7830	8,4736	13,5865	7,5014	13,7326	9,0749
15	22,9826	13,1980	14,5045	7,1194	17,2625	6,8273
16	26,0286	10,2321	13,5063	12,6355	22,8085	21,4460
17	14,8632	20,0454	14,3876	11,3769	14,9821	14,6912
18	28,0254	11,7671	26,2420	18,8730	23,4394	13,7985
19	12,6646	15,9118	20,6686	11,3502	10,4356	7,8750
20	21,3891	12,7818	21,9404	14,3333	13,0099	13,4219
Mittel	12,0549	8,3335	10,6247	6,2109	10,6429	8,2042

Die Werte schwanken von 0,3308 IE/ml·h (Proband 4, Präparat B) bis 28,0254 IE/ml·h (Versuchsperson 18, Präparat A). Der Prozentsatz (bezogen auf die Fläche bis zum 24-Stunden-Wert, den Transit, die als 100 Prozent angesetzt wurde) variiert von 0,2472 % (Teilnehmer 4, Präparat B) bis zu 21,4460% (Proband 16, Präparat C).

Diese Daten zeigen, daß die hier eingesetzte Methode der Gesamtflächenberechnung bis zu 20 % an Genauigkeit gegenüber der Teilflächenbewertung (nur innerhalb der Meßperiode) gewinnt.

4.3. Die Resorptionsquoten

4.3.1. Die Werte für den resorbierten Anteil

Aus der letzten Spalte von Tabelle 49 (aufgenommene Dosis relativ zur Zufuhr) läßt sich durch Multiplikation mit 100 der resorbierte Anteil der oral verabreichten Dosis entwickeln (Tabelle 51, Abbildung 20).

Tabelle 51 Die Resorptionsquoten

Proband	resorbierter Anteil der Zufuhr (%)		
	Präparat A	Präparat B	Präparat C
1	49,18	59,60	28,29
2	64,38	58,50	31,24
3	80,30	62,36	74,24
4	38,86	29,13	35,88
5	78,78	91,76	42,11
6	46,50	42,92	54,31
7	65,57	45,15	56,26
8	74,09	75,63	75,97
9	32,31	82,89	104,82
10	58,07	52,99	41,15
11	34,29	46,32	47,14
12	72,66	142,83	83,46
13	92,76	78,36	74,53
14	85,23	99,60	84,43
15	79,42	86,36	106,89
16	127,24	53,65	57,56

Fortsetzung Tabelle 51

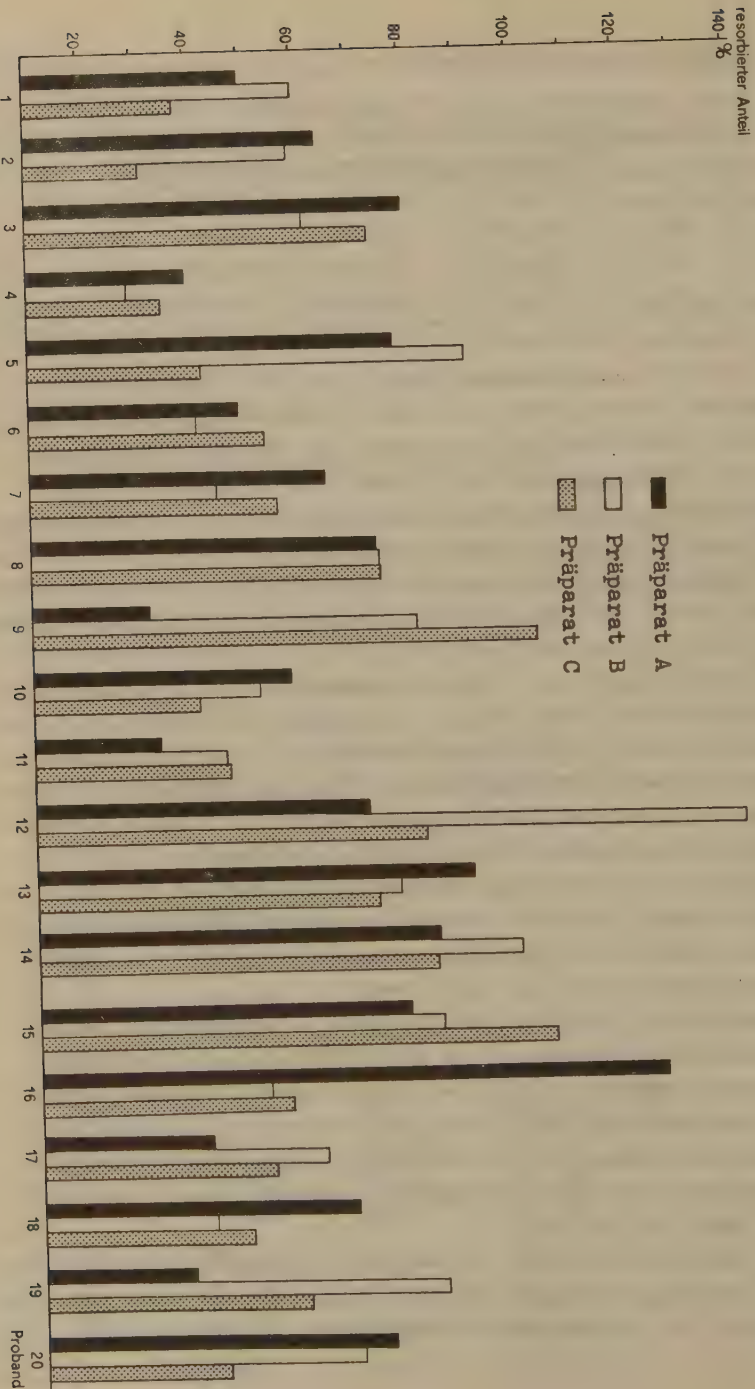
Proband	resorbierter Anteil der Zufuhr (%)		
	Präparat	A Präparat B	Präparat C
17	40,92	63,60	52,82
18	68,87	42,00	49,14
19	38,40	85,06	59,96
20	76,58	69,75	43,81

Die beiden hier auftretenden Werte, die weit über 100 % liegen (Proband 12 mit Präparat B und Versuchsteilnehmer 16 mit Teststoff A), bedürfen der Erklärung, da sie die Schwankungsbreite der Bestimmungsmethode (siehe 3.6.6.) überschreiten. Im Zusammenhang mit der relativ zur Zufuhr resorbierten Dosis (siehe 4.2.1., Tabelle 49 und Abbildung 19) wurde bereits darauf eingegangen. Abbildung 19 zeigt für Teilnehmer 16 deutlich den späten und dann starken Anstieg des Blutspiegels, wie er aus dem 6-Stunden-Wert ersichtlich ist (siehe Tabelle 46,2). Der aus physiologischer Sicht zu erwartende rasche Abfall des Blutspiegels wird nicht erfaßt, da erstens 18 Stunden bis zur nächsten Bestimmung vergehen und zweitens beide Blutkonzentrationswerte linear verbunden werden. Wäre der Zeitabstand zwischen den Blutanalysen geringer, so würde die lineare Kurvenzeichnung keine solche Ungenauigkeiten verursachen. Der hohe Wert in der sechsten Stunde und der große Abstand bis zur nächsten Messung sind mit Ursache zu weiter Flächenbegrenzung und damit einer hier erheblichen Verschiebung des als resorbiert berechneten Anteils nach oben.

Diese Betrachtung ist auch auf Proband 12 anzuwenden, dessen Blutspiegel zwar schneller und höher ansteigt als im obigen Falle (siehe Tabelle 46,3), der jedoch nach 6 Stunden einen überdurchschnittlich hohen Blutspiegel zeigt. Auch hier wird durch die Aufteilung der Gesamtfläche in Trapeze zu viel Fläche erfaßt und der als resorbiert berechnete Anteil der applizierten Dosis ist zu hoch.

Es wäre jedoch unzulässig, diese beiden Testkurven bei der Auswertung auszusparen, denn der methodische Fehler kann auch bei den Werten, die 100 % nicht überschreiten, auftreten, ohne

Abbildung 20 Säulendiagramm der resorbierten Anteile einer oral zugeführten Dosis (%)



daß er beachtet würde. Er liegt ja in der zu erwartenden Größenordnung, bestimmt aber das Ergebnis mit.

Unabhängig von diesen Zusammenhängen, die das Einbeziehen aller Resorptionsquoten erfordern, wurde Proband 12 nicht in die statistische Bewertung einbezogen. Er erkrankte während der Testperiode.

4.3.2. Die Differenzen der aufgenommenen Anteile

Wie unter 3.7.2. begründet, wurden im nächsten Schritt die Paarvergleiche durchgeführt (Tabelle 52, Abbildung 21).

Tabelle 52 Differenzen des resorbierten Anteils (%)

Pro-band	Präparate			Pro-band	Präparate		
	A zu B	A zu C	B zu C		A zu B	A zu C	B zu C
1	10,42 -	20,89	31,31	11	12,03 -	12,85 -	0,82 -
2	5,88	33,14	27,26	12	70,17 -	10,80 -	59,37
3	17,94	6,06	11,88 -	13	14,40	18,23	3,83
4	9,73	2,98	6,75 -	14	14,37 -	0,80	15,17
5	12,98 -	36,67	49,65	15	6,94 -	27,47 -	20,53 -
6	3,58	7,81 -	11,39 -	16	73,59	69,68	3,91 -
7	20,42	9,31	11,11 -	17	22,68 -	11,90 -	10,78
8	1,54 -	1,88 -	0,34 -	18	26,87	19,73	7,14 -
9	50,58 -	72,51 -	21,93 -	19	45,66 -	20,56 -	25,10
10	5,08	16,92	11,84	20	6,83	32,77	25,94

4.3.3. Die Häufigkeitsverteilung der Differenzen der resorbierten Anteile

Ordnet man die Versuchspersonen bestimmten Intervallen der Größe der Differenzen im Paarvergleich zu, so entsteht folgendes Bild (Tabelle 53, Abbildung 22 bis 24).

Abbildung 21 Graphische Darstellung des Paarvergleichs
 (Die Reihenfolge der Säulen entspricht der fortlaufenden
 Numerierung der Probanden)



Tabelle 53 Häufigkeitsverteilung der Resorptionsdifferenzen
(ungleiche Intervalle)

Präparat	Klassenbreite	Anzahl an Personen	
		absolut	prozentual
A zu B	unter - 72 bis über - 20	4	20
	unter - 20 bis über - 10	4	20
	unter - 10 bis über 0	2	10
	unter 0 bis über + 10	5	25
	unter + 10 bis über + 20	2	10
	unter + 20 bis über + 75	3	15
A zu C	unter - 75 bis über - 20	3	15
	unter - 20 bis über - 10	3	15
	unter - 10 bis über 0	2	10
	unter 0 bis über + 10	4	20
	unter + 10 bis über + 20	3	15
	unter + 20 bis über + 75	5	25
B zu C	unter - 25 bis über - 20	2	10
	unter - 20 bis über - 10	3	15
	unter - 10 bis über 0	5	25
	unter 0 bis über + 10	1	5
	unter + 10 bis über + 20	3	15
	unter + 20 bis über + 60	6	30

Abbildung 22 Histogramm (mit ungleichen Intervallen) der
Paarvergleiche

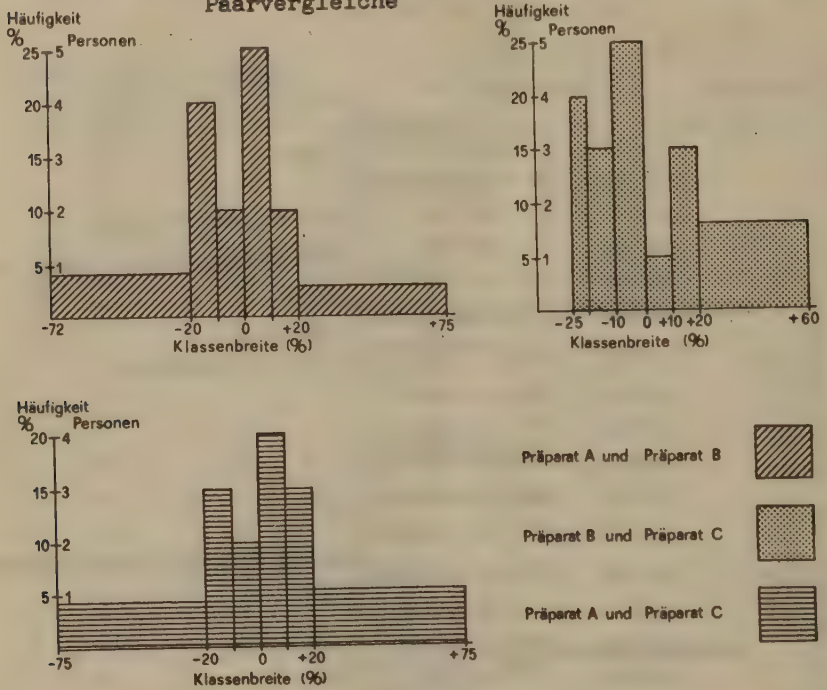


Abbildung 23 Häufigkeitspolygon der Differenzen der Resorptionsquoten

Präparat A und B Präparat A und C Präparat B und C

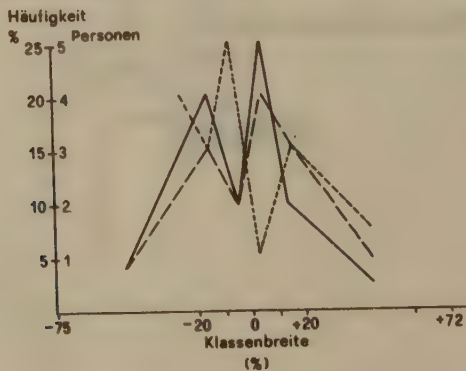
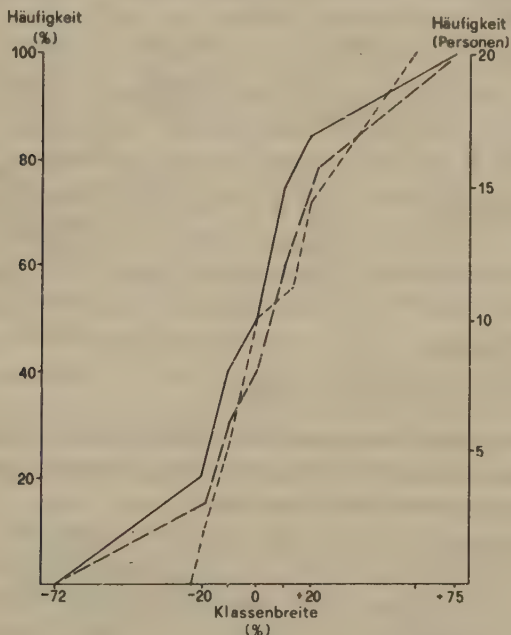


Abbildung 24 Kumulative Häufigkeitsverteilung der Differenzen der Resorptionsquoten

Präparat A und B Präparat A und C Präparat B und C



4.3.4. Statistik

Für diese Auswertungsstufe fielen zwei Personen aus, da Proband 12 während der Untersuchungsperiode an einem Hautausschlag erkrankte und Teilnehmer 14 während eines interkurrenten grip-palen Infektes Vitamintabletten einnahm. Die Statistik umfaßt 18 Personen. Sie erbrachte nachstehende Daten (Tabelle 54).

Tabelle 54 Die Resorptionsdifferenzen in der Statistik

	Präparat		
	A zu B	A zu C	B zu C
Spannweite (%)			
von	- 50,58	- 72,51	- 21,93
bis	+ 73,59	+ 69,68	- 59,37
gesamt	124,17	142,19	81,30
arithmetisches Mittel	1,1938	6,1888	4,9950
Standardabweichung	27,5493	30,7413	19,8860
Varianz	758,9643	945,0307	395,4544
t-Test	0,1838	0,8541	1,0656

4.4. Weitere Ergebnisse

4.4.1. Die geschmackliche Beurteilung

Zwölf der zwanzig Versuchspersonen wurden gefragt, welches der beiden Präparate B und C sie vorziehen würden, wenn der Geschmack ausschlaggebend sein sollte.

Dazu muß beigelegt werden, daß Fabrikat B unverdünnt und Substanz C verdünnt gereicht wurden. Die Ungleichheit lag darin begründet, daß für Präparat B im beiliegenden Anwendungszettel Verdünnung nicht vorgeschrieben war und sich bei Vorversuchen keine Abneigung der Probanden feststellen ließ.

Von den Befragten lehnten neun Präparat B ab, während es dreien gleichgültig war.

Präparat A konnte in diesen Geschmacksvergleich nicht einbezogen werden, denn es wurde in Kapseln gereicht (siehe 3.3.1.), die unzerkaut zu schlucken waren.

4.4.2. Die Nahrungsaufnahme und das Rauchen

Zusammenhänge zwischen der Versorgung der Untersuchungsteilnehmer und den Blutnüchternwerten oder den Verlaufskurven im Belastungstest wurden nicht festgestellt.

Auch die registrierte Dauer der Frühstückseinnahme konnte nicht in Beziehung zu den Ergebnissen gebracht werden.

Das gleiche war der Fall bezüglich des Tabakkonsums.

4.4.3. Die Resorptionsgeschwindigkeit

Zur Fragestellung, ob eines der drei Präparate schneller oder langsamer aufgenommen wird als die anderen (vergleiche Jones 71, Abbildung 8), kann mit dieser Untersuchung kein Beitrag geliefert werden. Dafür gibt es drei Begründungen:

1. Ein isolierter Vergleich der zu jeweils entsprechenden Zeitpunkten gemessenen und um den Nüchternwert korrigierten Blutspiegelwerte nach Gabe verschiedener Vitamin A-Zubereitungsformen hat nach der unter 1.2.1. gegebenen Begründung nur eine geringe Aussagekraft.
2. Der Vergleich der Teilflächen vom Applikationszeitpunkt bis zur jeweiligen Messung (vergleiche 3.7.1.5.) ist nicht möglich. Diese Teilflächen entsprächen dem Transit (siehe Abbildung 18), d.h. verglichen würde die eingetretene und bereits eliminierte Stoffmenge, die in diesem Augenblick noch im Blut enthaltene bliebe unberücksichtigt. Diese Occupancy nimmt für jeden Test und jede Person einen anderen Wert an (Tabelle 50 belegt das) und schränkt damit die Vergleichbarkeit der Teilflächen ein.
3. Auch wenn Occupancy einbezogen würde, käme man der Lösung nicht näher, denn dies ist unzulässig. Durch die Kenntnis der stoff- und individualspezifischen Eliminationskonstanten und des Verteilungsvolumens ist zwar die Berechnung von Occupancy für jeden Meßzeitpunkt möglich (der Rechner führte das auch tatsächlich durch - siehe 3.7.1.7.2.), aber die Ergebnisse sind nicht verwertbar, da die Eliminationskonstante für diesen Zeitraum noch nicht eingesetzt werden darf. Durch den Verlauf der Serumkonzentrationskurve nach intravenöser Belastung, der in den ersten 2,5 Stunden von mehreren e-Funktionen abhängt, wird der Gültigkeitsbereich der Konstanten auf den Zeitraum beschränkt, für den sie berechnet wurde - ab 2,5 Stunden nach vollständiger Resorption. Das würde nicht mehr in die ersten sechs Stunden des Tests mit oraler Applikation fallen. Darum wären die errechneten Daten ohne Aussagekraft.

5. Diskussion

5.1. Das Ziel der Arbeit (siehe 2.2.)

Der Versuch sollte die Resorptionsquoten von Vitamin A-Handelspräparaten bestimmen, so wie sie in der Tendenz zu erwarten wären, wenn die Einnahme den Empfehlungen der entsprechenden Hersteller folgt.

Die Versuchspersonen wurden dafür zu einer überschaubaren und vor allem unter sich vergleichbaren Gruppe zusammengestellt und die Form der Applikation für jedes Präparat festgelegt. Die naturwissenschaftlich exakte Arbeit begann mit der Blutabnahme und den Serumanalysen.

5.2. Der Versuchsaufbau (siehe 3.)

1. Die Probanden zeigten im Hinblick auf Alter und Geschlecht die unter 2.1.3.1.a geforderte Homogenität.

Ihre Gesundheit wurde auf zwei Wegen überwacht:

a. In einer Befragung (siehe 3.1.) vor der Aufnahme in die Versuchsgruppe mußten sie über mögliche Leber- und Gallenkrankheiten, Magen-Darmbeschwerden oder -operationen und Erkrankungen wie Diabetes mellitus Auskunft geben.

b. Während der 23-tägigen Belastungsperiode wurde das Wohlbefinden immer neu kontrolliert. So schied Proband 14 aus der statistischen Bewertung aus, da er infolge eines grippalen Infektes nicht mehr die Voraussetzungen des Versuchs erfüllte. Desgleichen mußte auf Versuchsperson 12 verzichtet werden, in diesem Fall wegen eines Hautausschlags. Die Versuchsgruppe erfüllte die bei 2.1.3.1.b aufgestellten Kriterien.

2. Unter 2.1.3.1.c wurde Vergleichbarkeit der Präparate bei den einzelnen Untersuchungen gefordert. Die hier verwendeten Testsubstanzen unterliegen als Handelsfabrikate dem Betriebsgeheimnis, so daß die Art und Menge der Bestandteile nicht dargelegt werden kann.

Eine wichtige Zielsetzung der Forschung wäre es, Kenntnisse über die Wirkung der Teilchengröße in den Emulsionen auf physiologische, resorbierende Systeme zu sammeln, wie es Haubold (62 bis 64) und Kakemi (75), sowie Luther (106) bereits unter-

nahmen. Welche Teilchengröße, mußte man fragen, wird möglichst unabhängig vom individuellen Habitus, d.h. von möglichst vielen Personen optimal aufgenommen.

3. Betreffs der Dosis (vergleiche 2.1.3.1.d) von 168 000 IE je Proband seien zwei Bemerkungen hinzugefügt.

a. Der Rechner überträgt die Einheitsdosis auf Belastung je kg Körpergewicht (Tabelle 32). Gleichung (21) wurde innerhalb des Programms umgestaltet (Ausdruck 23) (vergleiche dazu 3.7.1.7.1.).

$$(23) \quad \frac{\frac{D_{\text{res.}}}{W}}{\frac{D_{\text{appl.}}}{W}} \cdot 100 = \text{resorbierter Anteil}$$

Dadurch wurde die Exaktheit der Dosierung (siehe 3.3.3.), die bei der Einheitsdosis größer ist als bei individuellen Teststoffmengen, verbunden mit der höheren Aussagekraft der Belastung, die den individuellen Faktor Körpergewicht einbezieht, obwohl sie für verschiedene Personen verschieden groß ist.

b. Die Dosishöhe liegt weit unter der Toxizitätsgrenze. Es sollte der Bereich der auf dem Hinweiszettel empfohlenen Stoßtherapie erfaßt werden (für Präparat B: drei Tage lang je 75 000 IE, bei Präparat C 100 000 IE bis 200 000 IE in einer Dosis). Damit liegt die verabreichte Vitamin A-Menge unterhalb der in der Literatur angegebenen (Tabelle 24) Dosis.

4. Der Fettgehalt des Testmahls wäre ein Faktor, der die Vergleichbarkeit der Versuche verschiedener Wissenschaftler beeinträchtigt (2.1.3.2.e) (Kasper 78). Hier wollte man der Forderung nach angemessenem Fettgehalt der Nahrung genüge tun, aber zugleich die Resorptionssteigerung aufgrund der Emulgatoren klar herausstellen und nicht durch reiche Fettzugabe verdecken lassen.

5. Die Schwankungen der chemischen Untersuchungsmethode lagen unter 10 % (siehe 3.6.6., Tabelle 45). Bezieht man das auf den Nüchternwert und die Meßwerte nach der Belastung, so kann die Fläche um rund $\pm 4\%$ schwanken. Die Unterschiede im Endergebnis (Tabelle 52) sind jedoch erheblich größer, so daß dies nicht ins Gewicht fallen kann.

6. Unter 1.2.1.5. und 2.1.3.2.g wurden die verschieden langen Untersuchungsperioden (Tabelle 6) bemängelt. Dieser Einfluß-

faktor entfällt für die hier eingesetzte Auswertung über das pharmakokinetische Modell, das immer von der Gesamtfläche (also der Zeit bis zur Wiederherstellung des alten Gleichgewichtsniveaus) ausgeht. Allerdings kann man die Ergebnisse der Flächen- und der Blutspiegelwertmethode nicht nach gleichem Maßstab bewerten.

7. Die Ungenauigkeit, die durch relativ große Zeitabstände zwischen den einzelnen Blutprobennahmen bei der jeweiligen Auswertungsmethode entsteht, ist bei der Bewertung der Flächen geringer als beim direkten Vergleich der einzelnen Blutspiegelwerte. Zeitlich engere Bestimmungsintervalle verringern allerdings den Methodenfehler der linearen Meßwertverbindung (Abbildung 19 und 4.3.1.). Allerdings wurde in Vorversuchen für die Testserie keine solch starke zeitliche Verschiebung des Resorptionsanstiegs festgestellt, wie es sich im Hauptversuch ergab. Die öftere Bestimmung innerhalb von sechs Stunden wurde erst aufgrund der vorbereitenden Tests festgelegt.

5.3. Die Ergebnisse

1. Die weite Streuung der Vitamin A-Nüchternwerte (Tabelle 46, 47) überrascht nicht. Auch die Angaben der Literatur (u.a. Mex 117, Kimbel 85, Kasper 78, 81, 96) schwanken.

2. Eine nachhaltige Beeinflussung der Vitamin A-Versorgung der Untersuchungsteilnehmer im Verlauf der Belastungen, woraus auf veränderte kinetische Verhältnisse zu schließen wäre, konnte nicht erkannt werden (siehe 4.1.2.).

3. Die Zwischenergebnisse (Tabelle 48), die das Rechenprogramm lieferte, besitzen nur eingeschränkte Verwendbarkeit, wie es unter 5.2. dargestellt wurde.

4. Der Zugewinn an Genauigkeit durch die pharmakokinetische Ermittlung der Gesamtfläche gegenüber der Flächenberechnung innerhalb einer beliebigen Untersuchungsperiode wird durch den Vergleich der Werte für Occupancy deutlich. Man wird immer um die Bestimmung der totalen Fläche bemüht sein müssen.

5. Die in Tabelle 51 wiedergegebenen Resorptionsquoten sind nur Zwischenergebnisse zur Aufstellung des Paarvergleichs,

dessen Daten einen weiten Ausschlag in den positiven wie in den negativen Bereich zeigen (Tabelle 52, Abbildung 21). Dabei könnte eine tendenzmäßige Häufung zu bestimmten Klassen (siehe 4.3.3.) zu finden sein, da zweimal die meisten Vertreter in der am stärksten positiven Klasse (+ 20 bis + 60 im Vergleich von Präparat B zu Präparat C und in der Klasse + 20 bis + 75 bei Präparat A verglichen mit C) und einmal in der Mitte (0 bis + 10: Präparat C auf Präparat A bezogen) auftreten (siehe Tabelle 53). Als Einzelinterpretation ergäbe sich für den Paarvergleich von Präparat A mit Präparat B eine leichte Häufung zur Mitte hin (die Klassenbesetzung steigt von vier auf fünf und geht zurück auf drei), für den Differenzvergleich von Präparat A zu Präparat C ein Anstieg von drei auf fünf Personen in einer Klasse und für den Vergleich der Resorptionsdifferenzen der Präparate B und C eine etwas stärkere Erhöhung (von zwei auf sechs Personen pro Klasse).

In Worten ausgedrückt heißt das, daß bei dem Paarvergleich zwischen Präparat A und B die häufigste Besetzung (nämlich fünf Personen von zwanzig) in der Klasse der etwas besseren Resorption von Präparat A liegt. Für den Vergleich zwischen Präparat A und Präparat C wäre festzustellen, daß die Gruppe, die Präparat A besser als Präparat C aufnimmt, zahlenmäßig geringer ist als die Gruppe, die Präparat C besser als Präparat A resorbiert. Dies wird bei der Betrachtung von Präparat B und C noch deutlicher sichtbar: bei einer höheren Anzahl von Probanden war nach Präparat B eine größere Resorptionsquote festzustellen als nach Präparat C. Man darf bei dieser Auslegung nicht den geringen Umfang der untersuchten Personengruppe vergessen, bei der eine Person bereits fünf Prozent der Gesamtheit ausmacht.

6. Die statistische Analyse zeigt noch einmal deutlich die erheblichen Schwankungen der Resorptionsdifferenzen (Tabelle 54).

Aufgrund der Streuungsmaße kann nicht entschieden werden, welches der verglichenen Präparate am besten aufgenommen wird. Dieses statistische Resultat harmonisiert nicht mit den größtenteils eindeutigen Ergebnissen des entsprechenden Schrifttums zugunsten von Vitamin A-Emulsionen (vergleiche 2.1.).

Man stellt sich die Frage, ob unter Umständen die Versuchsanordnung oder das Auswertungsverfahren die Ursache dafür sind.

Zunächst gilt festzustellen, daß der Untersuchungsaufbau die starken Schwankungen nicht verursachen kann, da durch streng geregelte Einnahme die Bedingungen für alle Probanden gleich waren.

Es wäre die Auswertung auf ihre Aussagekraft hin zu untersuchen. Geht man davon aus, daß wie eingehend dargelegt wurde (1.2.1.) das Maximum der Konzentrationsverlaufskurve durch seine Abhängigkeit von dem Untersuchungsleiter, der den Zeitpunkt der Blutprobennahme festlegt, kein wirklich geeigneter Maßstab für den Vergleich von vom Darmlumen ins Blut aufgenommenen Stoffmengen darstellt, so stößt man notgedrungen auf die Bestimmung der Fläche im Konzentrations-Zeit-Diagramm. Teilflächen, wie Week (162) (siehe 1.2.1.4.) oder Cuatrecasas für den Laktose-Toleranztest (17) festlegen, befriedigen nicht. Das Gesetz der korrespondierenden Flächen überzeugt unabhängig von jeder speziellen Fragestellung davon, daß die gesamte Fläche unter der Blutspiegelkurve ein adäquates Maß der mengenmäßigen Resorption darstellt.

Westermann (164) bezweifelt die Anwendbarkeit dieser Gesetzmäßigkeit auf den Vitamin A-Resorptionstest. Er begründet das einerseits mit der "ausgeprägten Proteinbindung", die für Vitamin A zuträfe und nach Dost selbst (31) die Entsprechung der Fläche nach intravenöser und oraler Applikation beeinträchtigt. Außerdem wären die Kurvenverläufe nach intravenös verabreichten Emulsionen kinetisch nicht verwertbar und diese Dosis sei nach Kasper (82) vom Organismus nicht ausnutzbar. Dagegen muß festgestellt werden, daß das Gesetz der korrespondierenden Flächen hier nicht direkt angewendet wurde (siehe 3.7.1.4.). Westermann schreibt (164), man könne nur über die Beziehung Fläche zu Dosis zum resorbierten Anteil der oral verabreichten Dosis gelangen. Dieses wurde hier durchgeführt (siehe 3.7.1.4.). Westermanns Untersuchung an Ratten bricht nach neun, bzw. elf Stunden ab. Oben wurde aber die Notwendigkeit der Flächenerfassung bis zur Wiederherstellung des alten Gleichgewichtsniveaus dargelegt. Um diese vollständige Fläche zu erhalten, muß der Test mit intravenöser Applikation durchgeführt und die beiden Größen Verteilungsvolumen und Eliminationskonstante auf die Belastungen mit oraler Verabreichung übertragen werden.

Mit seinem Argument, intravenöse und orale Applikation unterlägen verschiedener Kinetik, bezweifelt Westermann die Voraussetzung für die Übertragbarkeit. Als Gegenargument wäre darauf hinzuweisen, daß die Fläche bis zur 24. Stunde nach der Belastung (Transit) experimentell bestimmt wurde. Sie umfaßt mindestens 80 % der Gesamtfläche (Transfer) (siehe 4.2.2., Tabelle 50). Für den restlichen Anteil gibt es keine bessere Schätzung als die hier eingesetzte Methode. Auch Kasper (84) weist auf die unterschiedlichen Träger des intravenös eingebrachten und des aus dem Intestinaltrakt aufgenommenen Vitamin A hin. Nähere Untersuchungen über das Verhalten intravenöser Gaben müßten klären, welche Prozesse nach der Applikation ablaufen. McGillivray (113) führte solche Untersuchungen bereits für Carotin durch.

Es könnte die Meinung vertreten werden, daß ein direkter Vergleich der Gesamtfläche (Transfer) Unterschiede herauschälen könnte, die in der weiteren Auswertung verwischt werden. Auch dieser Rückgriff auf die Nähe der Originaldaten brächte keine höhere Aussagekraft, da die unterschiedlichen Belastungen je Gewichtseinheit noch nicht eliminiert wären (vergleiche dazu Tabelle 32 und 5.2.3., besonders Gleichung 23). Dazu müßte man die Beziehung Fläche zu Dosis je kg Gewicht aufstellen; dann hätten alle Teilnehmer die Vitamin A-Gabe eins. Dieses wurde vom Rechner nach einem zuvor noch eingeschalteten Zwischenschritt bereits durchgeführt (Gleichung 23, Tabelle 49 - Fußnote). Die Fläche (Transfer) wurde mit Hilfe der Clearance auf die Menge Vitamin A umgerechnet, die pro Gewichtseinheit aufgenommen wurde (Gleichung 20). Damit stehen sich gleiche Maßsysteme gegenüber (aufgenommene Menge zu applizierter Menge). Diese können verglichen werden.

Den vorstehenden Überlegungen nach kommt man zu der Schlußfolgerung, daß die pharmakokinetischen Größen und die Auswertungsstufen adäquat eingesetzt sind und auf anderen Wegen keine höhere Aussagekraft erreichbar ist.

So muß zum Schluß wiederholt werden, daß die Resorptionsquote der oral verabreichten Vitamin A-Präparate zu starken individuellen Schwankungen unterworfen ist, als daß statistisch gesicherte Einflüsse der Zubereitungsform auf die resorbierte Menge feststellbar wären.

6. Zusammenfassung

Nach einer Einführung in die biochemischen Stoffwechselwege des Vitamin A wird begründet, warum das Blutspiegelmaximum kein geeigneter Maßstab für die ins Blut aufgenommene Menge einer oral verabreichten Dosis darstellt.

Der Untersuchung der Resorptionsquoten von oral applizierten Vitamin A-Emulsionen mit unterschiedlichem Lösungsvermittler und einer Vitamin A-Lösung in Öl standen zwanzig freiwillige Studenten zur Verfügung. Sie erhielten jeweils 168 000 IE der emulgierten Präparate und 165 000 IE der Vitamin A-Öllösung in einer einzigen Dosis. Die Serumkonzentrationsverläufe wurden anhand der GDH-Methode nach Feldheim (38) aus Blutproben ermittelt, deren Abnahme sich über 24 Stunden hinzog. Die pharmakokinetischen Größen Verteilungsvolumen und Eliminationskonstante - in einem Belastungstest mit intravenöser Gabe von 168 000 IE Vitamin A ermittelt - ermöglichten es, die Gesamtfläche unter der Blutspiegelkurve bis unendlich zu erweitern und diese als Maßstab für die vom Darmlumen ins Blut eintretende Menge an Vitamin A anzusehen. Durch die Einbeziehung der applizierten Dosis ergaben sich die Resorptionsquoten.

Das Ergebnis der Versuchsreihe, die resorbierten Anteile der oral verabreichten Vitamin A-Mengen, zeigen so starke Schwankungen von Person zu Person, daß Einflüsse der Zubereitungsform der verschiedenen Präparate statistisch nicht sichergestellt werden konnten.

Literaturverzeichnis

1. Adlersberg, D., H. Sobotka, J. Nutrition, 25, 255, 1943
2. Adlersberg, D., J. Med., 44, 606, 1944
3. Barnes, B.C., E.E. Wollaeger, H.L. Mason, J. Clin. Invest., 29, 982, 1950
4. Baumann, C.A., B.M. Riising, H. Steenbock, J. Biol. Chem. 107, 705, 1934
5. Beaumont, J.-L., V. Beaumont, M. Antonucci, Rev. franc. Etudes clin. biol. 5, 593, 1960
6. Bisaz, S., Schw. med. Wschr., 82, 692, 1952
7. Blomstrand, R., B. Werner, Scand. J. Clin. Lab. Invest., 19, 339, 1967
8. Bolin, F.M., D.F. Eveleth, D.W. Bolin, Vet. Med., 45, 451, 1950
9. Braekkan, O.R., Int. Z. Vitaminforschung, 32, 284, 1961/62
10. Braekkan, O.R., Int. Z. Vitaminforschung, 33, 234, 1963
11. Brüggemann, J., W. Krauss, J. Tiews, Chem. Berichte, 85, 315, 1952
12. Brüggemann, J., J. Tiews, Zschr. Tierernährung Futtermittelkunde, 11, 20, 1956
13. Carr, F.H., E.A. Price, Biochem. J., 201, 427, 1926
14. Christensen, N.O., A. Engelund, P. Terp, Arch. Pharm. Chemi, 65, 562, 1958
15. Christensen, N.O., A. Engelund, J.A. Handler, P. Terp, Nord. Vet.-Med., 14, 270, 1962
16. Craig, R.G., L.M. Bergquist, Anal. Chem. 20, 304, 1948
17. Cuatrecasas, P., D.H. Lockwood, J.R. Caldwell, Lancet 1, 14 - 18, 1965
18. Cüppers, C., E. Wagner, Monatsblätter Augenheilkunde, 117, 59 - 69, 1950
19. David, F.S.K., P. Malathi, J. Ganguly, Biochem. J., 98, 662 - 668, 1966
20. David, J.S.K., J. Ganguly, Indian J. Biochem., 4, 14 -17, 1967
21. Dengler, H.J., Arzneimittelforschung, 21 (2), 1484, 1971
22. DGE (Deutsche Gesellschaft für Ernährung), Umschau Verlag, Frankfurt a. Main, 1962²
23. Dost, F.H., Georg Thieme Verlag, Leipzig, 1953

24. Dost, F.H., Rind, Int. Z. Vitaminforschung, Bern, 27, 479, 1957
25. Dost, F.H., Klin. Wschr., 36, 655, 1958
26. Dost, F.H., Klin. Wschr., 40, 732, 1962
27. Dost, F.H., Dt. med. Wschr., 87, 1833, 1962
28. Dost, F.H., E. Gladtke, Z. klin. Chem. 1, 14, 1963
29. Dost, F.H., Antibiotica et Chemotherapia, Fortschr., 12, Karger, Basel, 149, 1964
30. Dost, F.H., E. Gladtke, Klin. Wschr., 42, 784, 1964
31. Dost, F.H., Thieme Verlag, Stuttgart, 1968
32. Dost, F.H., Dt. med. Wschr., 95, 1713, 1970
33. Dost, F.H., Pharmacological and Clinical Significance of Pharmakokinetics, Symposia Medica Hoechst, 12.5.1969, F.K. Schattauer Verlag, Stuttgart, 1970, S. 23
34. Dost, F.H., in: Raspé, G. (Hrsg.), Advances in Biosciences 5, Pergamon Press, Vieweg, Oxford, Braunschweig, 1970, S. 3
35. Dost, F.H., Arzneimittelforschung, 21, 712, 1971
36. Dost, F.H., H.M.v. Hattingberg, Europ. J. Clin. Pharmacol., 3, 252, 1971
37. Dost, F.H., Klin. Wschr., 50, 410, 1972
38. Feldheim, W., Int. Z. Vitaminforschung, Bern, 27, 8, 1956
39. Fidge, N.H. et al., J. Lipid Res., 9, 103, 1968
40. Fidge, N.H., D.S. Goodman, J. Biol. Chem., 243, 4372, 1968
41. Fitzgerald, O., J.J. Fennelly, D.J. Hingerty, Gut, 3, 74, 1962
42. Fox, J.H., N.C. Durham, J., J. Lab. Clin. Med., 34, 1140, 1949
43. Fredricksen, D.S., Physiol. Rev., 38, 585, 1958
44. French, J.E., B. Morris, J. Physiol. 138, 326, 1957
45. Fujita, A., K. Kimura, J. Vitaminology, 6, 6, 1960
46. Ganguly, J., N.I. Krinsky, Biochem. J., 54, 177, 1953
47. Ganguly, J. in: Harries, R.S. (Hrsg.), Vitamins and Hormones, Academic Press, N.Y., London, 18, 1960, S. 387
48. Ganguly, J., Am. J. Clin. Nutr., 22, 923, 1969
49. Garrett, E.R., in: Raspé, G. (Hrsg.), Advances in Biosciences 5, Pergamon Press, Vieweg, Oxford, Braunschweig, 1970, S. 7

50. Gaßmann, B., J. Proll, H. Schmandke, W. Rödel, *Int. Z. Vitaminforschung*, Bern, 36, 117, 1966
51. Gažo, M., W. Feldheim, O. Sladká, unveröffentlicht
52. Gitlin, D., *J. Clin. Invest.*, 37, 172, 1958 a
53. Glatke, E., *Antibiotica et Chemotherapia, Fortschr.*, Karger, Basel, 12, 159, 1964
54. Glover, J., T.W. Goodwin, R.A. Morton, *Biochem. J.*, 41, 97, 1947 b
55. Glover, J. in: Harris, R.S. (Hrsg.), *Vitamins and Hormones*, Academic Press, N.Y., London, 18, 371, 1960
56. Goodman, D.S., R. Blomstrand, B. Werner, H.S. Huang, T. Shiratori, *J. Clin. Invest.*, 45, 1615, 1966
57. Goodman, D.S., H.S. Huang, M. Kanai, T. Shiratori, *J. Biol. Chem.*, 242, 3543, 1967
58. Green, J. in: Morton, R.A. (Hrsg.), *Fat-Soluble Vitamins*, Pergamon Press, London, 1970, S. 71
59. Guggenheim, K., W. Koch, *Biochem. J.*, 38, 256, 1944
60. Harris, P.L. in: Harris, R.S. (Hrsg.), *Vitamins and Hormones*, Academic Press, N.Y., London 18, 341, 1960
61. Hattingberg, H.M.v., E. Glatke, in: Raspé, G., (Hrsg.), *Advances in Biosciences* 5, Pergamon Press, Vieweg, Oxford, Braunschweig, 1970, S. 185
62. Haubold, H., E. Heuer, H. Loew, R. Rohuschinsky, *Milchwiss.*, 15, 392, 1960
63. Haubold, H. et.al., *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 64, 606, 1962
64. Haubold, H., et al., *Med. Ern.*, 8, 202, 1967
65. Hoch, E.G., *Brit. J. Exp. Path.*, 27, 316, 1946
66. Hohlweg, W., M. Dohrn, *Z. exp. Med.*, 71, 763, 1930
67. Hopkins, F.G., *J. Physiol.*, 44, 425, 1912
68. Hoppe, P., J. Brüggemann, *Int. Z. Vitaminforschung*, 42, 98, 1972
69. Huang, H.S., D.S. Goodman, *J. Biol. Chem.* 240, 2839, 1965
70. IUPAC- IUBC on Biochemical Nomenclature, *Biochem. Biophys. Acta*, 107, 1, 1965
71. Jones, C.M., P.J. Culver, G.D. Drummey, A.E. Ryan, *Ann. Int. Med.*, 29, 1, 1948
72. Kahan, J., *Scand. J. Gastroent.*, 4, 313, 1969

73. Kahan, J., Scand. J. Gastroent., 5, 5, 1970
74. Kahan, J., Diss., Stockholm, 1970
75. Kakemi, K., H. Sezaki, S. Muranishi, Chem. Pharm. Bull., 18, 1563, 1970
76. Kanai, M., A. Raz, D.S. Goodman, J. Clin. Invest., 47, 2025, 1968
77. Karrer, P., R. Morf, K. Schöpp, Helv. Chim. Acta, Basel, 14, 1431, 1931
78. Kasper, H., Habil.-schrift, Gießen, 1969
79. Kasper, H., Klin. Wschr., 41, 83, 1963
80. Kasper, H., H.A. Kühn, Klin. Wschr., 46, 1227, 1968
81. Kasper, H., Int. Z. Vitaminforschung, Bern, 38, 142, 1968
82. Kasper, H., Int. Z. Vitaminforschung, 39, 18, 1969
83. Kasper, H., B. Ernst, Int. Z. Vitaminforschung, Bern, 39, 23, 1969
84. Kasper, H., pers. Mitteilung, 27.11.1971
85. Kimbel, K.H., M. Wigger, Arzneimittelforschung, 4, 703, 1954
86. Knappstein, H., Int. Z. Vitaminforschung, 30, 59, 1959
87. Krennrich, O., Diss., Gießen, 1964
88. Krinsky, N.L., D.G. Cornwell, J.L. Oncley, Arch. Biochem. Biophys., 73, 233, 1958
89. Krishnamurthy, S., J. Ganguly, Nature, 177, 575, 1956
90. Krishnamurthy, S., S. Mahadevan, J. Ganguly, J. Biol. Chem., 233, 32, 1958
91. Kübler, W., Mschr. Kinderheilkunde, 106, 281, 1958
92. Kübler, W., Dt. med. Wschr., 88, 1319, 1963
93. Kübler, W., H. Lorenz, Int. Z. Vitaminforschung, 33, 411, 1963
94. Kübler, W., Gastroenterology Suppl. 104, 231, 1965 a
95. Kübler, W., Mschr. Kinderheilkunde, 113, 308, 1965
96. Kübler, W. in: H. Kress, K.U. Blum (Hrsg.), Vitamine A, E und K, F.K. Schattauer Verlag, Stuttgart, 1969, S. 161
97. Kübler, W., Vitamine 2, 21, 1970 (Hoffmann-La Roche, Basel)
98. Kübler, W., Ann. Hyg. L. Fr. - Med. et Nut., T. 6, 33, 1970
99. Kunz, E., Diss. München, 1953
100. Lang, K., Biochemie der Ernährung, Dietrich Steinkopf Verlag, Darmstadt, 1970²

101. Leitner, Z.A., T. Moore, Brit. J. Nutr., 14, 157, 1960
102. Lewis, J.M., O. Bodansky, J. Birmingham, S.Q. Cohlman, J. Pediat., 31, 496, 1947
103. Lewis, J.M., S.Q. Cohlman, Med. Clin. N. Amer., 34, 413, 1950
104. Lippel, K., J.A. Olsen, J. Lipid. Res., 9, 168, 1968
105. Litwin, E., Práce Materialy Naukowe IMD, 5, 119, 1965
106. Luther, H.G., E.J. Goett, G.O. Cragwell, Int. Z. Vitaminforschung, 23, 362, 1951
107. Mahadevan, S., J. Ganguly, Biochem. J., 81, 53, 1961
108. Mahadevan, S., P.S. Sastry, J. Ganguly, Biochem. J., 88, 531, 1963
109. Mahadevan, S., P.S. Sastry, J. Ganguly, Biochem. J., 88, 534, 1963
110. Mahadevan, S., N.I. Ayoub, O.A. Roels, J. Biol. Chem., 241, 57, 1966
111. Maier, U., Diss. Gießen, 1964
112. Marsh, J.B., Fed. Proc., 21, 411, 1962
113. Mc Gillivray, W.A., Brit. J. Nutr., 15, 313, 1961
114. Meine, W., Nahrung, 16, 17, 1972
115. Mendeloff, A.J., J. Clin. Invest., 33, 1015, 1954
116. Meunier, P., Bull. Soc. Chim. France, 13, 73, 1946
117. Mex, A., W. Michel, H. Muth, Ärztl. Forschung, 11, 98, 1957
118. Mizukami, N., J. Osaka City. Med. Center, 9, Suppl. 1, 1397, 1960
119. Moffa, D.J., F.H. Lotspeich, R.F. Krause, J. Bio. Chem., 245, 439, 1970
120. Moore, T., Vitamin A, Elsevier Publishing Company, Amsterdam 1957
121. Moore, T., Exp. Eye Res., 3, 305, 1964
122. Moore, T. in: Sebrell, W.H. jr., R.S. Harries (Hrsg.), The Vitamins, 1, 1-12, Academic Press, N.Y., 1967²
123. Moore, T. In: Morton, R.A. (Hrsg.) Fat-Soluble Vitamins, Pergamon Press, London, 1970, S. 223
124. Murray, T.K., H.C. Grice, Can. J. Biochem. Physiol., 39, 1103, 1961
125. Neeld, J.B., W.N. Pearson, J. Nutr., 79, 454, 1963
126. Nieman, C., H.J. Klein-Obbinsky in: Harris, R.S., G.F. Marrian, K.V. Thimann (Hrsg.), Vitamins and Hormones, 12, 69, Academic Press, N.Y., 1954

127. Olsen, J.A., Fed. Proc., 28, 1670, 1969
128. Paterson, J.C.S., H.S. Wiggins, J. Clin. Path., 7, 52, 1954
129. Peterson, P.A., Acta Univ. Uppsaliensis, Abstracts of Uppsala, Disstertations in Medicine, Nr. 75, 1969
130. Popper, H., F. Steigmann, J. Amer. Med. Ass., 123, 1108, 1943
131. Popper, H., Phys. Res., 24, 205, 1944
132. Popper, H., B.W. Volk, Proc. Soc. Exper. Biol., Med., 68, 562, 1948
133. Popper, H., F. Steigmann, H.A. Dyniewicz, Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 73, 188, 1950
134. Ralli, E.P., E. Papper, K. Paley, E. Bauman, Arch. Int. Med., 68, 102, 1942
135. Riechert, W., Krankenhausarzt, 2, 17, 1955
136. Roels, O.A., Present Knowledge in Nutrition, Nutr. Found., Inc., N.Y., 1967², S. 51
137. Rote Liste 1965, Bundesverband der pharmazeutischen Industrie e.V. (Hrsg.), Editio Cantor - Aulendorf, Württ.
138. Sastry, P.S., J. Ganguly, Biochem. J., 80, 397, 1961
139. Schiaparelli, P., P.C. Gamalero, Min. Ped., 7, 303, 1955
140. Schneider, B., Pharmacological and Clinical Significance of Pharmakokinetiks, Symposia Medica Hoechst, 57, F.K. Schattauer Verlag, Stuttg. 1970
141. Seidel, D., Ärztl. Forschung, 21, 320, 1971
142. Shelanski, M.V., Technisches Gutachten der Industrial Biology Research and Testing Laboratories, 8.11.1960
143. Sherman, W.C., G.O. Kuhn et al., J. Animal Sci., 17, 586, 1958
144. Sibbald, I.R., L.M. Hutcheson, Poultry Sci., 39, 99, 1960
145. Silvermann, M., A.J. Oitney, J. Biol. Chem., 233, 1179, 1958
146. Skála, I., F. Hrubá, J. Havlíková, Am. J. Physiol., 206, 458, 1964
147. Sobel, A.E., H. Werbin, J. Biol. Chem., 159, 681, 1945
148. Sobel, A.E., S.D. Snow, J. Biol. Chem., 171, 617, 1946
149. Sobel, A.E., M. Sherman, O. Lichtblau, S.D. Snow, J. Nutr., 35, 325, 1948
150. Souci, S., W. Fachmann, H. Kraut, Die Zusammensetzung der Lebensmittel, Wiss. Verlagsgesellschaft, Stuttg., 1964

151. Srikantia, S.G., V. Reddy, Am. J. Clin. Nutr., 23, 114, 1970
152. Strohecker, R., H.M. Hennig, Verlag Chemie GmbH, Weinheim
(Bergstraße), 1963, S. 35
153. Studnitz, G.V., Klin. Monatsblätter Augenheilkunde, 111, 154,
1946
154. Stüttgen, G., H. Wüst, Arzneimittelforschung, 8, 161, 1958
155. Suzuki, F., Y. Sahashi, J. Vitaminology, 3, 288, 1957
156. Tiews, J., Med. Klin., 58, 499, 1963
157. Tiews, J. in: Zöllner, N., D. Eberhagen (Hrsg.), Untersuchun-
gen und Bestimmungen der Lipoide im Blut, Sprin-
ger Verlag, Berlin, 1965
158. Underwood, B.A., H. Siegel, R.C. Weisel, M. Dolinski, Am. J.
Clin. Nutr., 23, 1037, 1970
159. Volk, B.W., H. Popper, Gastroenterology, 14, 549, 1950
160. Wagner, K.-H., Klin. Wschr., 32, 87, 1954
161. Wald, G., R. Hubbard in: Morton, R.A. (Hrsg.), Fat-Soluble
Vitamins, Pergamon Press, Oxford, 1970
162. Week, E.F., F.J. Sevigne, J. Nutr. (USA), 40, 563, 1950
163. Wendt, Klin. Wschr., 16, 1175, 1937
164. Westermann, K.H., Int. Z. Vitaminforschung, 42, 104, 1972
165. Westermann, K.H., pers. Mitteilung
166. WHO-Study Group, Pharmacologia Clinica 2, 241, 1970
167. Wodsack, W., Nahrung, 5, 581, 1961
168. Wulf, K., G.H. Nibbe, Arzneimittelforschung, 5, 120, 1955
169. Zachmann, R.D., M. B. Singer, J.A. Olsen, J. Nutr., 88, 137,
1966

Lebenslauf

- 26.7.1946 geboren in Linden Kreis Landshut
Eltern: Der Elektroingenieur Johannes
Boese und seine Ehefrau Erna, geb.
Jenkner
- 23.4.1952 - 13.3.1963 Besuch der Grund- und Realschule in
Darmstadt, Mittlere Reife
- 14.4.1963 - 9.3.1966 Schülerin der Frauenfachschule in Darm-
stadt, Staatsprüfung als Hauswirt-
schaftsleiterin
- 12.4.1967 Reifeprüfung für Fachschulabsolventen
- 19.4.1967 - 13.4.1971 Studium der Ernährungswissenschaften an
der Justus Liebig-Universität Gießen,
Diplom
- 1.5.1971 - 30.11.1972 Doktorandin am Institut für Ernährungs-
wissenschaft I der Justus Liebig-Uni-
versität Gießen
- 9.7.1971 Erste Staatsprüfung für das Lehramt an
beruflichen Schulen hauswirtschaft-
licher und nahrungsgewerblicher Fach-
richtung
- seit 1.12.1972 Studienreferendarin an der Wingert-
schule Friedberg

Herrn Prof. Dr. W. Feldheim, Institut für Ernährungswissen-
schaft I der Justus Liebig-Universität Gießen, danke ich für
die Überlassung des interessanten Themas und die Unterstützung
bei der Bearbeitung, Herrn Dr. H.M.v.Hattingberg, Universitäts-
kinderklinik Gießen, für die theoretischen Erörterungen der
Auswertungswege und die Bereitstellung des Rechners.
Die Untersuchung wurde von der Firma E. Merck Darmstadt groß-
zügig gefördert.

